



Au-delà du cerveau : une importance majeure de la huntingtine et de sa phosphorylation à la sérine 421 dans les cancers du sein

Morgane Thion

► To cite this version:

Morgane Thion. Au-delà du cerveau : une importance majeure de la huntingtine et de sa phosphorylation à la sérine 421 dans les cancers du sein. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA114823 . tel-01374852

HAL Id: tel-01374852

<https://theses.hal.science/tel-01374852>

Submitted on 2 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE 425

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

POLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

DISCIPLINE : Physiopathologie cellulaire et moléculaire

ANNÉE 2014 - 2015

SÉRIE DOCTORAT N° 1294

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 03/10/2014

par

Morgane THION

**Au-delà du cerveau : une importance majeure
de la huntingtine et de sa phosphorylation à la
sérine 421 dans les cancers du sein**

Composition du jury :

Directrice de thèse :

Président du jury :

Rapporteurs :

Examineurs :

Sandrine HUMBERT

Christian POÛS

Keltouma DRIOUCH

Anselme PERRIER

Philippe CHAVRIER

Pierre CLOSE

DR2 INSERM (CNRS, Institut Curie)

Professeur, Université Paris Sud 11

Chargé de biologie (Institut Curie)

CR1 INSERM (I-STEM)

DR1 CNRS (Institut Curie)

Chercheur qualifié FRS-FNRS, Université de Liège (GIGA)

A mes parents, Marianne et Jean-Marc,

A ma grand-mère, Anne-Marie.

« Si les conquêtes utiles à l'humanité touchent votre cœur, si vous restez confondus devant les effets surprenants de la télégraphie électrique, du daguerréotype, de l'anesthésie et de tant d'autres découvertes admirables [...] prenez intérêt, je vous en conjure, à ces demeures sacrées que l'on désigne du nom expressif de laboratoire. Demandez qu'on les multiplie et qu'on les orne. Ce sont les temples de l'avenir, de la richesse et du bien-être. C'est là que l'humanité grandit, se fortifie et devient meilleure. Elle y apprend à lire dans les œuvres de la nature, œuvres de progrès et d'harmonie universelle, tandis que ses œuvres à elle sont trop souvent celles de la barbarie, du fanatisme et de la destruction... »

Pasteur

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	1
TABLE DES TABLEAUX.....	5
TABLE DES FIGURES.....	7
INTRODUCTION.....	9
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	15
CHAPITRE 1. LA GLANDE MAMMAIRE NORMALE.....	17
<i>I. Origine et caractéristiques fonctionnelles de la glande mammaire</i>	17
<i>II. Structure de la glande mammaire</i>	17
II.1. Structure anatomique de la glande mammaire	17
II.2. Composition cellulaire de la glande mammaire.....	19
II.2.1. Les cellules épithéliales luminales.....	20
II.2.2. Les cellules myoépithéliales basales	20
II.2.3. Les cellules souches de la glande mammaire	21
II.3. L'environnement de la glande mammaire	26
<i>III. Développement de la glande mammaire</i>	27
III.1. La glande mammaire embryonnaire et fœtale	27
III.2. Le développement pubertaire de la glande mammaire.....	29
III.3. La plasticité gestationnelle de la glande mammaire	30
CHAPITRE 2. LES CANCERS DU SEIN : GÉNÉRALITÉS, CLASSIFICATIONS ET TRAITEMENTS	33
<i>I. Épidémiologie des cancers du sein</i>	33
I.1. Incidence des cancers du sein	33
I.2. Mortalité des cancers du sein	35
<i>II. Étiologie du cancer du sein</i>	37
II.1. Facteurs de risques environnementaux et comportementaux.....	37
II.2. Facteurs de risques héréditaires.....	39
II.2.1. Généralités.....	39
II.2.2. Gènes <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i>	40
II.2.3. Autres prédispositions à forte pénétrance	43
<i>III. Trier l'hétérogénéité intertumorale : classifications des cancers du sein</i>	43
III. 1. La classification histologique.....	43
III.1.1. Les carcinomes <i>in situ</i>	44
III.1.2. Les carcinomes infiltrants	44
III.2. La classification TNM	45
III.3. Le grade SBR ou grade histopronostique et l'index de Nottingham	47
III.4. Classification moléculaire des cancers du sein	49
III.4.1. Les sous-types luminaux A et B.....	51
III.4.2. Le sous-type HER2.....	52
III.4.3. Le sous-type basal	53
III.4.4. Les autres sous-types.....	55

III.5. Concordances entre les classifications histologique et moléculaire	55
III.6. Classifications moléculaires, modèles en développement	56
V. Traitements	56
V.1. Chirurgies.....	56
V.2. Radiothérapies.....	57
V.3. Chimiothérapies	57
V.4. Thérapies ciblées	58
V.4.1. Hormonothérapies.....	58
V.4.2. Thérapies anti-HER2	58
CHAPITRE 3. LA CASCADE TUMORALE MAMMAIRE : DES ORIGINES À LA COLONISATION	61
I. <i>Cellule d'origine et cellules souches cancéreuses</i>	61
II. <i>Évolution moléculaire de la progression tumorale</i>	63
III. <i>Les différentes étapes de la cascade métastatique</i>	65
III.1 La transition épithélio-mesenchymateuse.....	65
III.2. L'invasion du tissu peritumoral	67
III.3. L'intravasation dans la circulation	67
III.4. La survie dans la circulation : résistance à l'anoïkis	67
III.5. L'extravasation de la circulation	68
III.6. La colonisation métastatique des organes secondaires.....	68
IV. <i>Le microenvironnement tumoral</i>	69
V. <i>Modèles d'étude</i>	71
V.1. Les lignées cellulaires.....	71
V.1.1. Les lignées cellulaires humaines	72
V.1.2. La lignée murine 4T1.....	73
V.2. Modèles murins non transgéniques	74
V.2.1. Greffes	74
V.2.2. Injection dans la veine de la queue.....	74
V.3. Les modèles murins génétiquement modifiés.....	75
V.3.1. Le modèle MMTV-PyVT	75
V.3.2. Les modèles conditionnels.....	76
CHAPITRE 4. LA MALADIE DE HUNTINGTON ET LA PROTEINE HUNTINGTINE	79
I. <i>Découverte de la maladie de Huntington</i>	79
I.1. Une protéine à répétitions CAG	79
I.2. Symptômes et physiopathologie de la maladie de Huntington	80
I.3. Nombre de répétitions CAG et maladie de Huntington	82
I.3.1. Au-delà de 39 répétitions : pénétrance complète.....	82
I.3.2. De 36 à 39 répétitions : pénétrance incomplète.....	84
I.3.3. De 27 à 35 répétitions : allèles intermédiaires.....	85
II. <i>La huntingtine : généralités</i>	86
II.1. Expression et localisation de la huntingtine	86
II.2. Aspects structuraux de la huntingtine	88
II.3. Modifications post-traductionnelles de la huntingtine.....	89
II.4. Les partenaires de la huntingtine	90
III. <i>Fonctions de la huntingtine</i>	90

III.1. Transcription	92
III.2. Dynamiques intracellulaires	92
III.3. Division cellulaire	94
III.4. Apoptose	95
IV. <i>La phosphorylation à la sérine 421</i>	96
IV.1. AKT, SGK, et calcineurine régulent la phosphorylation de la HTT à la sérine 421	96
IV.2. Rôles dans la direction du transport vésiculaire	97
IV.3. La phosphorylation à la sérine 421 dans la maladie de Huntington	97
CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	101
RÉSULTATS	105
ARTICLE 1. LA HTT ET SA PHOSPHORYLATION A LA S421 DANS LE CANCER DU SEIN	107
ARTICLE 2. LE POLYMORPHISME CAG DE LA <i>HTT</i> SAUVAGE DANS LE CANCER DU SEIN	155
DISCUSSION & PERSPECTIVES	183
I. <i>La HTT et sa phosphorylation à la sérine 421 dans l'adhésion intercellulaire</i>	186
I.1. Les jonctions serrées	186
I.2. Les jonctions adhérentes	189
II. <i>Quels sont les mécanismes à l'origine de la régulation transcriptionnelle de la HTT ?</i>	190
III. <i>La phosphorylation de la HTT dans les cancers du sein</i>	191
IV. <i>Longues répétitions CAG et prévalence des cancers : un mal pour un bien ?</i>	195
V. <i>Implication du polymorphisme CAG de la HTT dans l'âge d'apparition des cancers</i>	197
VI. <i>La répétition CAG de la HTT et les cancers HER2 : meilleurs amis ?</i>	199
VII. <i>L'instabilité des répétitions CAG de la HTT dans les cancers</i>	199
VIII. <i>Les complices de la HTT dans les cancers</i>	200
IX. <i>La prévalence de la MH est-elle sous-estimée ?</i>	201
CONCLUSION GÉNÉRALE	203
ANNEXES	207
ARTICLE 3. LA HTT MUTANTE DANS LE CANCER DU SEIN	209
ARTICLE 4. LA HTT SAUVAGE DANS LA MAMMOGENÈSE	231
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	251

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10
ADH	atypical ductal hyperplasia
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
ALH	atypical lobular hyperplasia
AKT/PKB	protéine kinase B
AML	actine musculaire lisse
ALDH1	aldéhyde déshydrogenase 1
aPKC	protein kinase c alpha
APP	amyloid precursor protein
AP-2	adaptor protein 2
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP	adénosine-5'-triphosphate
ARN	acide ribonucléique
β-TRCP	β-transducin repeat containing protein
BARD1	BRCA1 associated ring domain 1
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BCL2	B-cell lymphoma 2
BRCA1,2	breast cancer susceptibility gene 1,2
CAG	cytosine-adénine-guanine
CBP	cAMP-response element binding protein
CD	cluster of differentiation
CCIS	carcinome canalaire <i>in situ</i>
CDH1	cadherin 1, E-cadherin
CHEK2	checkpoint kinase 2
CLI	carcinome lobulaire infiltrant
CLIS	carcinome lobulaire <i>in situ</i>
CNA	copy number abberation
CNV	copy number variant
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
CXCR4	C-X-C motif receptor 4
DLG	discs, large homolog
EGF	epithelial growth factor
EGFR	epithelial growth factor receptor
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
ESR1	estrogen receptor 1

FACS	fluorescence activated cell sorting
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FOXA1	forkhead box protein A1
GABA	gamma-aminobutyric acid neurotransmitter
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GATA3	trans-acting T-cell specific transcription factor binding protein 3
GFP	green fluorescent protein
GRB7	growth factor receptor-bound protein 7
HAP1	huntingtin associated protein 1
HEAT	huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2a, and TOR1
HER2/ERBB2	human epidermal growth factor receptor 2
HIP1	huntingtin interacting protein 1
HIP14	huntingtin interacting protein 14
HIPP1	huntingtin interacting protein 1-interacting protein
HTT	huntingtine
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IGF-2	insulin-like growth factor 2
IGF-1-R	insulin-growth factor 1 receptor
IT-15	interesting transcript 15
JAK	janus kinase
K/KRT	kératine
LGN	leucine-glycine-asparagine enriched protein
MA	maladie d'Alzheimer
MaSC	mammary stem cell
MEC	matrice extracellulaire
MH	maladie de Huntington
miARN	micro ARN
MMP	matrice metalloproteinase
MMTV	mouse mammary tumor virus
MP	maladie de Parkinson
MUC1	mucine 1
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NuMA	nuclear mitotic apparatus protein
NES	nuclear export signal
NFKB	nuclear factor kappa B
NLS	nuclear localization signal

NPI	nottingham prognostic index
OMS	organisation mondiale de la santé
P150^{Glued}	dynactine 1
PALB2	partner and localizer of BRCA2
PAR3	partitioning defective gene-3
PAR6	partitioning defective gene-6
PCM1	pericentriolar material 1
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1
PDK2	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2
PH	pleckstrin homology
PI3K	phosphatidyl-inositol-3-kinase
PI3KCA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
(PI3,4,5)P3	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PolyP	répétitions de prolines
PolyQ	répétitions de glutamines
PP1	protéine phosphatase 1
PP2A	protéine phosphatase 2
PP2B	protéine phosphatase 2A
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PyVT	polyoma virus middle T protein
RAD51C	RAD51 paralog C
RANKL	receptor activator for nuclear factor – kappa B ligand
REST/NRSF	repressor element-1 transcription factor/neuron restrictive silencer factor
RH	récepteur aux hormones
RO	récepteur aux œstrogènes
RP	récepteur à la progestérone
RT-PCR	reverse-transcriptase polymerase chain reaction
SBMA	spinal and bulbar muscular atrophy
SBR	scarff-bloom-richardson
SMAD3	SMAD family member 3
SNP	single nucleotide polymorphism
SNV	single nucleotide variant
STAT	signal transducer and activator of transcription
STK11	serine/threonine kinase 11
TEB	terminal end bud
TEM	transition épithélio-mésenchymale
TGF-β	transforming growth factor β
TME	transition mésenchymato-épithéliale

TNS	type non spécifiques
TP53/P53	transforming protein 53
UICC	union internationale du cancer
UTDL	unité terminale ductolobulaire
UTR	untranslated region
VEGF	vascular endothelial-derived growth factor
WAP	whey acidic protein promoter
WNT	wingless-type MMTV integration site family
XBP1	X-box binding protein 1
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1
ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2
ZO1	zona occludens protein 1

TABLE DES TABLEAUX

TABLE 1 TABLEAU RÉCAPITULANT LES FACTEURS DE RISQUE DU CANCER DU SEIN.	37
TABLE 2 TABLEAU RÉCAPITULANT CERTAINES CARACTÉRISTIQUES PATHOLOGIQUES DES CANCERS ASSOCIÉS À <i>BRCA1</i> ET <i>BRCA2</i>	42
TABLE 3 CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE DU CANCER DU SEIN ÉTABLIE PAR L'OMS RÉVISÉE EN 2012.	45
TABLE 4 CLASSIFICATION TNM DU CANCER DU SEIN ET STADE TUMORAL ÉTABLIE PAR L'UICC RÉVISÉE EN 2010 (7ÈME ÉDITION).....	46
TABLE 5 GRADE HISTOPRONOSTIQUE SCARFF BLOOM RICHARDSON MODIFIÉ PAR ELLIS ET ELSTON.....	47
TABLE 6 CARACTÉRISTIQUES HISTOPATHOLOGIQUES, BIOLOGIQUES ET CLINIQUES DES SOUS-TYPES MOLÉCULAIRES DES CANCERS DU SEIN.	54
TABLE 7 CARACTÉRISTIQUES MOLÉCULAIRES ET CLINIQUES DE DIFFÉRENTES LIGNÉES DE CARCINOMES MAMMAIRES HUMAINS.	73
TABLE 8 TABLEAU REPRÉSENTANT CERTAINS PARTENAIRES DE LA HTT.	91

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 ANATOMIE DE LA GLANDE MAMMAIRE.	18
FIGURE 2 SCHÉMA DES DEUX MODÈLES POTENTIELS DE LA HIÉRARCHIE CELLULAIRE MAMMAIRE.	24
FIGURE 3 LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.	27
FIGURE 4 LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DU DÉVELOPPEMENT DE LA GLANDE MAMMAIRE MURINE.....	28
FIGURE 5 INCIDENCE (BLEU) ET MORTALITÉ (ROUGE) MONDIALES DES CANCERS DU SEIN ESTIMÉES EN 2012 (OMS).	34
FIGURE 6 INCIDENCE (BLEU) ET MORTALITÉ (ROUGE) MONDIALES DES CANCERS DU SEIN ESTIMÉES EN 2012 (OMS). ...	35
FIGURE 7 ÉVOLUTION DE L'INCIDENCE (GAUCHE) ET DE LA MORTALITE (DROITE) DES CANCERS DU SEIN DANS DIFFÉRENTS PAYS DEPUIS 1975 (OMS). NOMBRES POUR 100 000 HABITANTS EN 2008 (FERLEY ET AL 2010).....	36
FIGURE 8 ÉTIOLOGIE DES CANCERS DU SEIN.	39
FIGURE 9 LES GÈNES IMPLIQUES DANS LES CANCERS DU SEIN HÉRÉDITAIRES.....	40
FIGURE 10 LES DIFFÉRENTS GRADES HISTOPRONOSTIQUES SELON LA CLASSIFICATION SBR.	48
FIGURE 11 SURVIE DES PATIENTES ATTEINTES D'UN CANCER DU SEIN EN FONCTION DE LEUR GROUPE NPI.....	49
FIGURE 12 LES SOUS-TYPES MOLÉCULAIRES DU CANCER DU SEIN.	50
FIGURE 13 SURVIE DES PATIENTES ATTEINTES D'UN CANCER DU SEIN EN FONCTION DES SOUS-TYPES.	51
FIGURE 14 LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA CARCINOGENÈSE MAMMAIRE.	62
FIGURE 15 SCHÉMA DE LA PROGRESSION TUMORALE CHEZ LE MODÈLE DE CANCER DU SEIN MMTV-PYVT.....	76
FIGURE 16 PREMIÈRE PAGE DU JOURNAL « MEDICAL AND SURGICAL REPORTER OF PHILADELPHIA ».....	79
FIGURE 17 EXEMPLE D'UN ARBRE GÉNÉALOGIQUE D'UNE FAMILLE ATTEINT DE LA MALADIE DE HUNTINGTON.....	80
FIGURE 18 NOMBRE DE RÉPÉTITIONS CAG ET MALADIE DE HUNTINGTON.....	81
FIGURE 19 LA MALADIE DE HUNTINGTON	83
FIGURE 20 LONGUEUR DE LA RÉPÉTITION CAG ET CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES DES INDIVIDUS ATTEINTS DE LA MH.....	84
FIGURE 21 PATRON D'EXPRESSION DE LA HTT DANS DIVERS TISSUS SAINS.	87
FIGURE 22 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA SÉQUENCE PROTÉIQUE DE LA HTT.	89
FIGURE 23 LA HTT RÉGULE L'ORIENTATION DU FUSEAU MITOTIQUE.	95
FIGURE 24 LA PHOSPHORYLATION À LA SERINE 421 DE LA HTT.	96
FIGURE 25 RÉGULATION DE LA DIRECTION DU TRANSPORT VÉSICULAIRE PAR LA S421-P-HTT.	97
FIGURE 26 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'EXPRESSION ET DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DE LA HTT (EN BLEU) ET DE LA S421-P-HTT (EN ROUGE) AU COURS DE LA PROGRESSION TUMORALE MAMMAIRE.	192
FIGURE 27 LA LONGUEUR DE LA RÉPÉTITION CAG ET LES CANCERS.	198
FIGURE 28 SCHÉMA RÉCAPITULATIF DE L'IMPLICATION DE LA HTT DANS LA DIVISION ET LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES SOUCHES MAMMAIRES.	234

INTRODUCTION

Lorsque Edwin Smith achète en 1862 un papyrus de cinq mètres, il ignore tenir entre ces mains un document historique. Ce collectionneur américain vient d'acquérir, à un marchand d'antiquités de Louxor en Egypte, la retranscription d'un manuscrit écrit vers 2500 ans av. J.C. par Imhotep. Traduit en 1930, ce manuscrit est la première description de cancer que nous possédions aujourd'hui. Imhotep, chirurgien égyptien, vizir de la cour du roi Djoser, y détaille méthodiquement quarante-huit cas pathologiques. Les superstitions, incantations qui abreuyaient son époque sont totalement absentes. Le chirurgien décrit, lors du quarante-cinquième cas, des « masses saillantes sur le sein » et « des tumeurs saillantes du sein [qui] signifient l'existence de gonflements sur la poi-

-trine, grands, en expansion et durs »*. « Les toucher, écrit-il, est comme toucher une boule de bandages ou elles peuvent être comparées au fruit du fenugrec pas mûr qui est dur et frais au toucher » ; sous la rubrique « thérapie », il est inscrit « il n'y en a aucune ».

Le cancer, maladie très ancienne, devait probablement être noyé dans l'océan des autres affections. En 450 av. J.C., le mot « cancer » du grec *karkinos*, désignant le crabe - référence à la forme de la tumeur dont les prolongements font penser aux pattes de l'animal - apparaît avec Hippocrate dans la littérature médicale. Les enseignements d'Hippocrate et de Galien se transmettent pendant plusieurs siècles, les médecins y restent fidèles. Le « saigner et purger » reste la principale thérapie. Au XVI^e siècle, Ambroise Paré, chirurgien français révolutionnaire, suggère l'extirpation du cancer « par l'œuvre manuelle du chirurgien si le chancre est petit » par une méthode particulière : la combustion de tumeur avec un morceau de fer chauffé à blanc et sa cautérisation par une pâte d'acide sulfurique. Au XVIII^e siècle, les mastectomies font leur apparition grâce au chirurgien écossais John Hunter. A cette époque, on essaie déjà de classer les tumeurs selon un grade. Les chirurgiens comprennent alors que la survie des individus ne dépend pas de la radicalité de la chirurgie - les mastectomies massives mutilent les corps des individus -, mais de l'étendue de la maladie avant la chirurgie. A la fin du XIX^e siècle, la chirurgie opératoire va progresser grâce à de grandes avancées scientifiques.



Papyrus Edwin Smith découvert en 1862 dans lequel apparaît la première allusion au cancer vers 2500 avant J.C.

*Siddhartha Mukherjee, *L'Empereur de toutes les maladies – Une biographie du cancer*, trad. Pierre Kaldy, Flammarion 2013.

En 1895, Wilhelm Röntgen, physicien allemand, découvre les rayons X. L'année suivante, Henri Becquerel met en évidence la radioactivité. Suite aux découvertes du polonium et du radium par Marie et Pierre Curie (1898), et de leurs différentes études, le début du XX^e siècle voit l'éclosion de la Radiothérapie et de la Curiethérapie. L'introduction du monde de la chimie dans celui de la médecine permet la création de la Chimiothérapie.

Ce n'est qu'à la fin du XX^e siècle que certaines avancées technologiques, et plus particulièrement les techniques d'analyse à haut débit, permettent d'importantes découvertes sur la biologie du cancer du sein. Des thérapies ciblées ont pu être développées grâce à la caractérisation des cancers, plus précisément au niveau moléculaire. Mais le cancer du sein, aujourd'hui le cancer féminin le plus fréquent, reste la première cause de mortalité dans les pays occidentaux chez les femmes entre 40 et 50 ans. Cette maladie multifactorielle, qui fait intervenir des facteurs hormonaux, environnementaux et héréditaires, n'est plus considérée comme une entité unique mais comme un éventail de plusieurs pathologies. Le développement et la progression tumorale sont des processus à étapes, initiés par la transformation, au sein du tissu mammaire, d'une ou plusieurs cellules ayant accumulé des anomalies génétiques. Ces cellules transformées prolifèrent de façon non contrôlée et conduisent à la formation d'une tumeur localisée au niveau du sein. Les cellules tumorales envahissent, dans la majorité des cas, les tissus environnants et se disséminent par la circulation sanguine et/ou lymphatique. Elles rejoignent ensuite des organes distants cibles, le foie, les os, les poumons et le cerveau, où une minorité d'entre elles seront capables de s'implanter pour former une nouvelle tumeur : la métastase. Malgré l'amélioration de la prise en charge des individus et des traitements, les métastases représentent à l'heure actuelle la cause majeure de mortalité par cancer et la principale cause d'échec des traitements des individus. Il est donc crucial, afin de traiter les femmes atteintes d'un cancer métastatique, de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui permettent à une cellule tumorale de métastaser dans des organes secondaires ; et de même, de découvrir des nouveaux marqueurs prédictifs à valeur thérapeutique.

La forme mutée de la protéine huntingtine (HTT) est connue pour être responsable de la maladie de Huntington, une maladie neurodégénérative rare se manifestant à l'âge adulte. Cette maladie est incurable et les individus présentent de sévères symptômes, tant cognitifs que moteurs. Etant donné la nature de leurs symptômes, de nombreuses recherches s'intéressent donc naturellement aux propriétés toxiques de cette protéine mutée dans le cerveau. Cependant, mon laboratoire d'accueil s'est beaucoup investi pour étudier le rôle de la HTT dans la glande mammaire normale et pathologique et j'ai eu l'opportunité, au cours de mon doctorat, de participer à ces études. Dans ce contexte, je me suis principalement appliquée à étudier les rôles de la HTT sauvage dans le cancer du sein. J'ai pu collaborer à deux autres études, l'une sur les rôles de la HTT mutée dans le cancer du sein, l'autre sur ceux de la HTT sauvage dans le développement de la glande mammaire.

La première partie de ce mémoire consiste en une synthèse bibliographique dans laquelle les différentes thématiques abordées au cours de ma thèse sont décrites. La structure ainsi que les différents stades de développement de la glande mammaire sont traités avant d'introduire le cancer du sein, les diverses classifications existantes et les traitements disponibles à ce jour. Les multiples étapes de la progression tumorale, indispensables à l'envahissement métastatique des tissus périphériques, seront abordées avec les modèles d'études disponibles. Enfin, je me suis attachée à décrire certains aspects de la maladie de Huntington et les fonctions de la HTT sauvage. L'ensemble des travaux sont présentés dans la seconde partie de ce manuscrit. Une dernière partie est consacrée à la discussion de ces travaux ainsi qu'à leurs perspectives.

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. La glande mammaire normale

La glande mammaire possède une structure complexe et subit plusieurs étapes de développement - embryonnaire, pubertaire et adulte - que nous allons brièvement analyser.

I. Origine et caractéristiques fonctionnelles de la glande mammaire

Du latin *sinus* signifiant courbure, sinuosité, pli, les seins contiennent les glandes mammaires. Ces dernières sont apparues chez les reptiles mammaliens au début du Permien (dernière période du Paléozoïque, de - 542 à - 252 millions d'années) et elles représentent une des caractéristiques anatomiques de la classe des mammifères. Présentes par paire, elles sont complètement développées chez la femme adulte, celles des hommes restant rudimentaires et non fonctionnelles tout au long de leur vie.

La fonction principale des glandes mammaires est de garantir la production, la sécrétion et la distribution de lait, indispensable à la nutrition et à la protection immunitaire des nouveaux nés et des nourrissons. Ce n'est qu'à l'âge adulte que la glande mammaire est entièrement développée, ne l'étant que très peu à la naissance. Cette dernière possède une forte plasticité qui va lui permettre de subir des changements majeurs durant les périodes de grossesse et d'allaitement afin d'assurer ses fonctions.

II. Structure de la glande mammaire

Deux glandes mammaires situées sur le thorax sont présentes dans les seins de la femme (Figure 1A) tandis que leur nombre varie de 1 à 8 paires chez les autres espèces mammifères. La souris en possède cinq le long de l'axe antéro-postérieur appelé la ligne mammaire, les trois premières sont thoraciques, et les quatrième et cinquième sont inguinales (Figure 1B) (pour articles de revue, (Richert et al., 2000; Hassiotou and Geddes, 2013)).

II.1. Structure anatomique de la glande mammaire

- Chez la femme :

Chaque glande mammaire est composée d'un arbre galactophorique qui contient 15 à 20 sous-unités indépendantes, les lobes mammaires, organisés de manière radiale autour du mamelon (Figure 1A). Ces lobes présentent un aspect en « grappe de raisin » et sont individuellement connec-

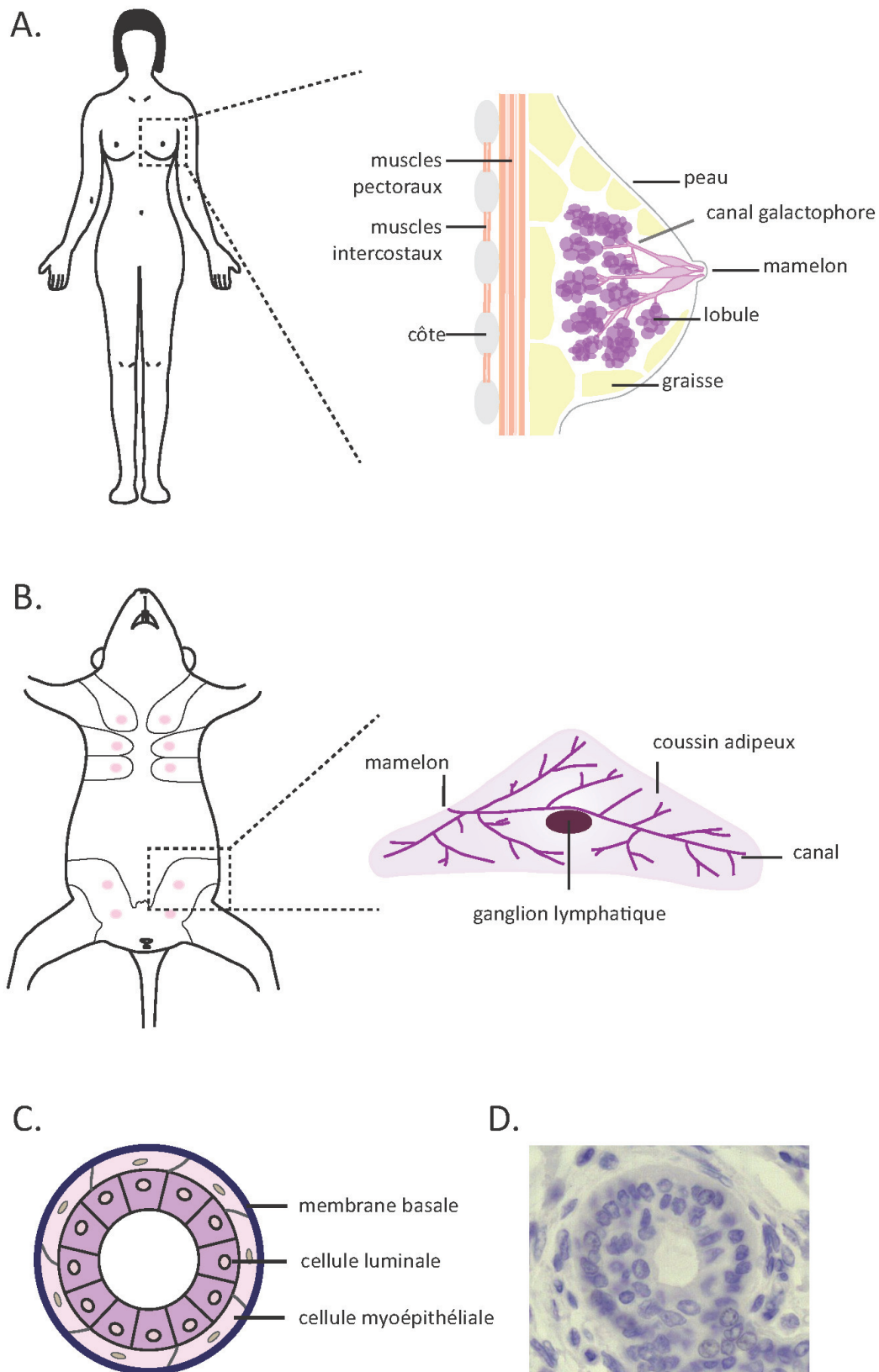


Figure 1 | Anatomie de la glande mammaire.

(A) Représentation schématique de la glande mammaire humaine et (B) murine. (C) Schéma d'un canal mammaire. (D) Histologie d'un canal mammaire humain.

-tés au mamelon par des canaux galactophores ou lactifères. Ils sont eux-mêmes composés de multiples lobules mammaires. C'est au sein de ces lobules que se situe la structure élémentaire fonctionnelle de la glande mammaire, l'alvéole ou acini. Chaque lobule possède plusieurs dizaines d'alvéoles (30 à 50 généralement). Il existe donc des canaux galactophores intra-lobulaires, puis inter-lobulaires et enfin inter-lobaires. L'unité fonctionnelle de la glande mammaire est appelée unité terminale ductolobulaire (UTDL) et comprend les canaux intra-lobulaires et les alvéoles qui en dérivent au sein d'un lobule. Le nombre d'UTDL et leur taille varie en fonction de l'âge de l'individu et des taux d'expression des hormones, notamment durant les périodes de reproduction. Ce n'est que durant la période de lactation que les alvéoles seront fonctionnelles et sécréteront du lait qui sera acheminé par les canaux galactophores jusqu'au mamelon. Entre les canaux galactophores et les glandes se trouve du tissu conjonctif et adipeux de soutien, le coussin adipeux ou stroma.

- Chez la souris :

L'organisation tissulaire de la glande mammaire murine est bien plus simple que celle de la femme. Elle est composée d'un réseau simple de canaux galactophores présentant plusieurs niveaux de ramifications (Figure 1B). Le mamelon est connecté au canal galactophore primaire qui draine l'ensemble des autres canaux galactophores. La glande mammaire murine ne possède pas d'UTDL comme la glande mammaire humaine mais son équivalent, des structures lobulo-alvéolaires localisées à l'extrémité des canaux galactophores, qui se différencieront pendant la lactation pour assurer leur fonction sécrétrice.

Il existe un gradient de différenciation des glandes, la première et la cinquième glande thoracique sont respectivement la moins et la plus développée (Bolander, 1990). La troisième et la quatrième paire de glandes mammaires sont les plus étudiées notamment car ce sont les plus faciles à disséquer. Un ganglion lymphatique est présent au centre du coussin adipeux de la glande mammaire.

II.2. Composition cellulaire de la glande mammaire

Chaque canal est composé d'une bicouche cellulaire : vers l'intérieur, bordant la lumière des canaux, se trouvent les cellules luminales et vers l'extérieur, une assise basale composée d'une fine couche de cellules myoépithéliales (Figure 1C). Cette bicouche est entourée d'une membrane protectrice, la membrane basale qui la protège et la sépare du tissu conjonctif adjacent. Chaque sous-type cellulaire est caractérisé par l'expression de marqueurs spécifiques en relation avec leurs fonctions qui permettent de les distinguer (Deugnier et al., 2002).

II.2.1. Les cellules épithéliales luminales

On distingue les cellules luminales canalaire, localisées au sein des canaux galactophores, des cellules luminales alvéolaires, localisées au sein des lobules, qui ont une activité sécrétrice durant la lactation. Les cellules épithéliales luminales expriment les cytokératines 7, 8/18 et sont caractérisées par l'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone (respectivement RO et RP) ainsi que par l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation luminale tels que *FOXA1* (forkhead box protein A1) et *GATA3* (trans-acting T-cell specific transcription factor binding protein 3).

Dans les organes solides telles que la glande mammaire, les cellules épithéliales sont fermement cohésives entre elles. Leurs fonctions cellulaires ne peuvent être assurées qu'après formation d'une polarité apico-basale. Elles expriment la E-cadhérine, marqueur des jonctions adhérentes mais aussi ZO1 (zona occludens protein 1), les occludines et les claudines présentes au niveau des jonctions serrées et les protéines impliquées dans la polarité cellulaire telles que celles du complexe formé de PAR3 (partitioning defective gene 3), PAR6 (partitioning defective gene 6) et de aPKC (protéine kinase C alpha).

II.2.2. Les cellules myoépithéliales basales

Les cellules myoépithéliales ont une forme stellaire allongée et sont définies comme étant « constitué de fibres musculaires et d'épithélium » (Med.Biol., t.2 1971). Elles partagent certaines caractéristiques des cellules musculaires, leur cytoplasme est riche en actine et en myosine mais comme les cellules épithéliales, elles présentent de nombreux filaments de kératines. Elles expriment certains marqueurs spécifiques qui permettent de les différencier des cellules luminales tels que l'actine musculaire lisse (AML), les cytokératines 5, 14 et 17, p63 ou encore la sous-unité $\beta 4$ des intégrines. Elles assurent plusieurs fonctions indispensables au fonctionnement de la glande mammaire (pour article de revue, voir(Sopel, 2010)).

Elles sécrètent de nombreux composants de la membrane basale tels que la laminine 1 et 5, le collagène 4 et la fibronectine participant ainsi tout au long du développement au maintien et à la polarisation des cellules épithéliales (Streuli and Bissell, 1990). Durant la puberté et l'involution de la glande mammaire, les cellules myoépithéliales participent à son développement et son remodelage en sécrétant les enzymes nécessaires à la dégradation de la matrice extracellulaire telles que certaines métalloprotéases (Talhok et al., 1992). Les cellules myoépithéliales matures présentent une activité contractile, essentielle pour l'acheminement du lait jusqu'au mamelon durant la lactation. La couche cellulaire myoépithéliale est continue au niveau des canaux galactophores alors qu'elle est plus discontinue au niveau des alvéoles.

II.2.3. Les cellules souches de la glande mammaire

Les fortes modifications et la plasticité de la glande mammaire observées lors du développement postnatal et des cycles de reproduction successifs suggèrent l'existence de cellules souches à l'intérieur de l'épithélium mammaire (MaSC, mammary stem cell). Comment se définit une cellule souche mammaire ? Les MaSCs sont des cellules souches indifférenciées multipotentes caractérisées par leur capacité à s'autorenouveler et à générer tous les types cellulaires de l'épithélium mammaire. Au cours d'une division cellulaire, une cellule souche peut (1) s'autorenouveler et s'amplifier par division symétrique, donnant naissance à deux cellules souches filles ou (2) engendrer une cellule souche et une cellule progénitrice lors d'une division asymétrique. Dès 1959, les travaux pionniers de Deome et al. ont largement contribué à la caractérisation des cellules souches mammaires en développant la technique de transplantation orthotopique de fragments de glande mammaire. Ils démontrèrent qu'une ébauche d'épithélium isolée était capable de régénérer une glande mammaire entière et fonctionnelle pendant la gestation au sein du coussin adipeux d'une souris receveuse (Deome et al., 1959). Les cellules à potentiel régénératif sont présentes dans toutes les régions de la glande mammaire et à tous les stades de développement (Young et al., 1971).

Ces expériences ont été les premières à suggérer l'existence de cellules souches dans la glande mammaire, bien que la nature non-clonale de la transplantation ne permette pas dans ce type d'expérience de définir précisément quelle(s) population(s) constitu(en)t les cellules souches. Pour pallier cette limitation, les cellules épithéliales peuvent être dissociées et identifiées en fonction de leurs propriétés intrinsèques avant de les transplanter. Elles sont préalablement triées par cytométrie de flux en fonction de l'expression de certaines protéines spécifiques de surface. Ainsi, non seulement une ébauche d'épithélium mammaire provenant d'une souris donneuse, mais également des cellules épithéliales isolées peuvent être greffées dans un coussin adipeux d'une souris receveuse syngénique de trois semaines (que l'on a préalablement dépourvue de son épithélium endogène) (Hoshino and Gardner, 1967; Daniel et al., 1968; Smith, 1996). Plusieurs semaines après la transplantation, le potentiel régénératif de l'épithélium greffé est analysé. Cette technique peut être utilisée à partir de tissu mammaire normal murin ou bien à partir de mammoplasties humaines. Elle est très avantageuse car (1) elle permet d'étudier le potentiel morphogène à long terme des épithéliums par transplantation sériée ; (2) les mécanismes intrinsèques et extrinsèques peuvent être disséqués étant donné que l'environnement receveur est contrôlé ; (3) deux conditions peuvent être testées au vu de la bilatéralité des glandes mammaires (donc dans le contexte hormonal d'un unique animal receveur). C'est ainsi que Shackleton et al. ont démontré qu'une seule et unique cellule épithéliale isolée est capable de constituer une glande mammaire (Shackleton et al., 2006).

- Caractérisation des cellules souches

En utilisant la technique de transplantation, des populations contenant des MaSCs ont été identifiées cependant elles sont très hétérogènes : elles sont enrichies en MaSCs mais au vu des profils d'expression génétique similaires des cellules basales et des MaSCs (Stingl et al., 2006), il reste très difficile de différencier ces deux populations. Ainsi, les MaSCs se situent dans l'assise basale de la glande et elles n'expriment pas les récepteurs aux hormones (Asselin-Labat et al., 2006). Chez les femmes, elles ont été localisées à l'état quiescent au niveau des canaux galactophores mais sont aussi présentes dans les lobules où elles apparaissent plus actives que dans les canaux (Villadsen et al., 2007). Les MaSCs murines seraient localisées dans l'ensemble du système lobulo-alvéolaire et c'est au cours des différentes phases du développement que leur localisation varierait. Durant le développement pubère, elles seraient préférentiellement focalisées au niveau des bourgeons terminaux, les TEBs (terminal end buds), des canaux en croissance tandis que durant la lactation, elles seraient absentes des lobules (Kenney et al., 2001).

Les MaSCs humaines expriment de fort taux d'expression de CD49f et de CD24 mais également l'enzyme aldéhyde déshydrogénase-1 (ALDH1), et les glycoprotéines transmembranaires CD133, et MUC1 (mucine 1) (Eirew et al., 2008; Lim et al., 2009a; Pece et al., 2010) et présentent une faible ou une absence d'expression de EpCAM (epithelial cell adhesion molecule). Ainsi, elles présentent un phénotype $CD24^{fort}$, $CD49f^{fort}$, $EpCAM^{-/faible}$, $ALDH^{+}$, $MUC1^{+}$, $CD133^{+}$. Les MaSCs murines représenteraient moins de 10% de l'épithélium mammaire et sont caractérisées par une forte expression de CD29 ($\beta 1$ -intégrine) et de CD49f ($\alpha 6$ -intégrine), une expression modérée à faible des molécule d'adhésion CD24 et EpCAM et une absence d'expression de SCA-1- (stem cell antigen 1) (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006; Sleeman et al., 2007). Ainsi, elles présentent un phénotype $CD29^{fort}$, $CD49f^{fort}$, $CD24^{+/faible}$, $EpCAM^{+}$, $SCA-1^{-}$.

- Isolement des cellules progénitrices

Contrairement aux cellules souches, les progéniteurs ont une capacité d'autorenouvellement limitée et vont subir plusieurs étapes progressives de maturation avant leur différenciation en un type cellulaire fonctionnel de l'épithélium mammaire (luminales, basales myoépithéliales). Ces progéniteurs, présents à la fois dans les cellules luminales et dans les cellules basales confèrent aux cellules épithéliales des propriétés clonogéniques que l'on peut étudier *in vitro* en deux ou trois dimensions (Shackleton et al., 2006; Joshi et al., 2010). En effet, en culture tridimensionnelle, des structures sphéroïdes d'origine clonale, les mammosphères se développent (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006; Asselin-Labat et al., 2007). La population de cellules luminales est très hétérogène et présente des progéniteurs à différents stades de différenciation (Shehata et al., 2012). Les cellules

luminales se distinguent des MaSCs car elles expriment des niveaux plus importants de CD24 (Sleeman et al., 2006). Elles sont caractérisées par l'expression de CD24^{fort} et de CD49f^{faible} et la population contenant les progéniteurs est enrichie en CD61 (intégrine β 3) (Asselin-Labat et al., 2007) mais elle peut aussi être caractérisée par une absence d'expression de SCA-1 et des niveaux faibles à négligeables de CD133 (Sleeman et al., 2007; Regan et al., 2012).

- Régulateurs moléculaires de la hiérarchie de l'épithélium mammaire

Les populations murines et humaines enrichies en MaSCs expriment de multiples gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymale (TEM) tels que *Snail2/Slug*, *Twist* et la vimentine qui pourraient participer à l'acquisition des propriétés des cellules souches (Mani et al., 2008; Guo et al., 2012). En culture, les cellules surexprimant *Twist* ou *Snail* présentent des propriétés caractéristiques des cellules souches (Mani et al., 2008). La perte de *Slug* ou de *Sox9* dans les cellules épithéliales mammaires réduit l'activité des MaSCs alors qu'à l'inverse, la coexpression de ces gènes entraîne la différenciation des cellules luminales en cellules souches présentant des capacités régénératives *in vivo* (Guo et al., 2012). Le développement pubertaire est retardé chez les souris déficientes pour *Slug* qui surexpriment les marqueurs de la différenciation luminale GATA-3 et les RO. Ces cellules perdent leur capacité à former des mammosphères démontrant le rôle important de *Slug* dans la régulation des cellules souches/progénitrices (Nassour et al., 2012).

La voie NOTCH est impliquée dans la maintenance des cellules souches, la spécification du destin cellulaire et la différenciation de nombreux types cellulaires. Une inactivation de l'effecteur de *NOTCH* Cbf-1 augmente les capacités régénératives *in vivo* des cellules épithéliales, impliquant cette voie dans l'inhibition de l'expansion des MaSCs (Bouras et al., 2008). Une étude récente a impliqué *NOTCH3* dans la quiescence des progéniteurs luminaux dans lesquels il est exprimé : l'activation de *NOTCH3* pourrait garder les cellules dans un état non prolifératif (Lafkas et al., 2013). Cette voie est particulièrement active lors de la différenciation des cellules luminales (Bouras et al., 2008; Raouf et al., 2008). Elle régulerait le développement alvéolaire au cours de la gestation en favorisant une différenciation luminale et en inhibant la prolifération des cellules basales *in vivo* (Buono et al., 2006).

GATA-3 appartient à la famille des facteurs de transcription GATA et, lui aussi, régule la différenciation luminale des cellules épithéliales mammaires. Une déplétion de son expression *in vivo* altère le développement pubertaire mais aussi adulte de la glande mammaire. Cela entraîne l'expansion des progéniteurs luminaux qui ne peuvent pas se différencier en cellules luminales (Asselin-Labat et al., 2007). De multiples protéines interagissant avec GATA-3, comme les RO et FOXA1, participent à la différenciation des progéniteurs luminaux.

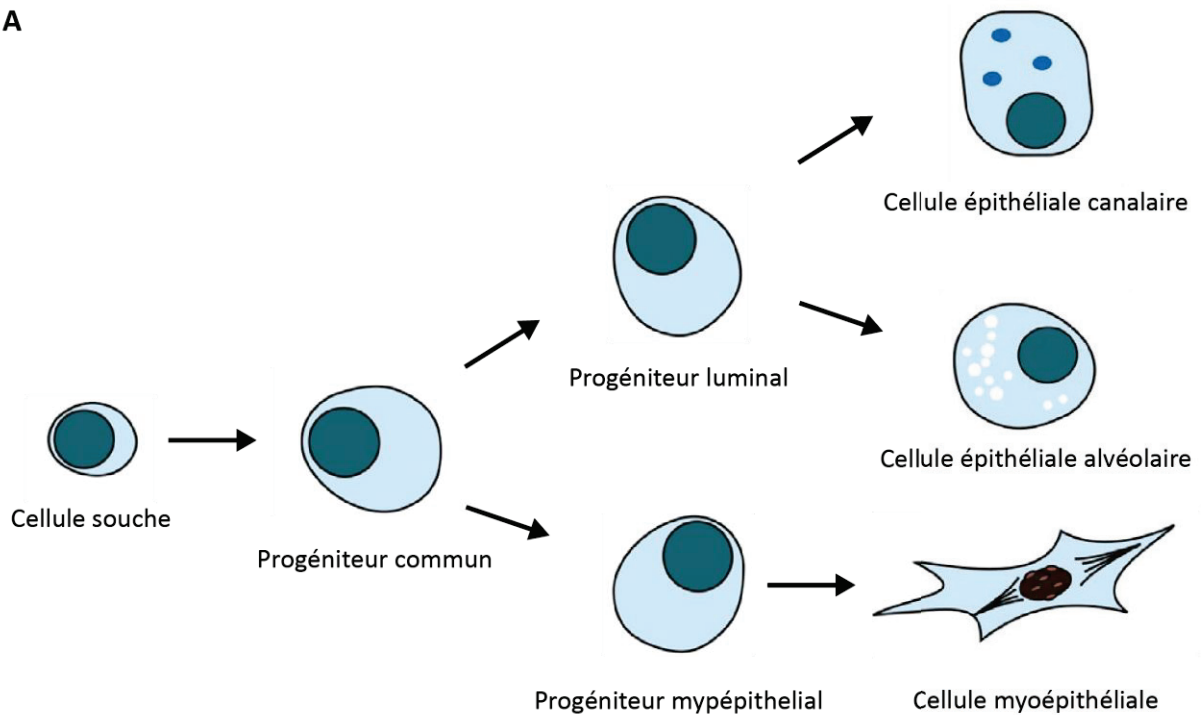
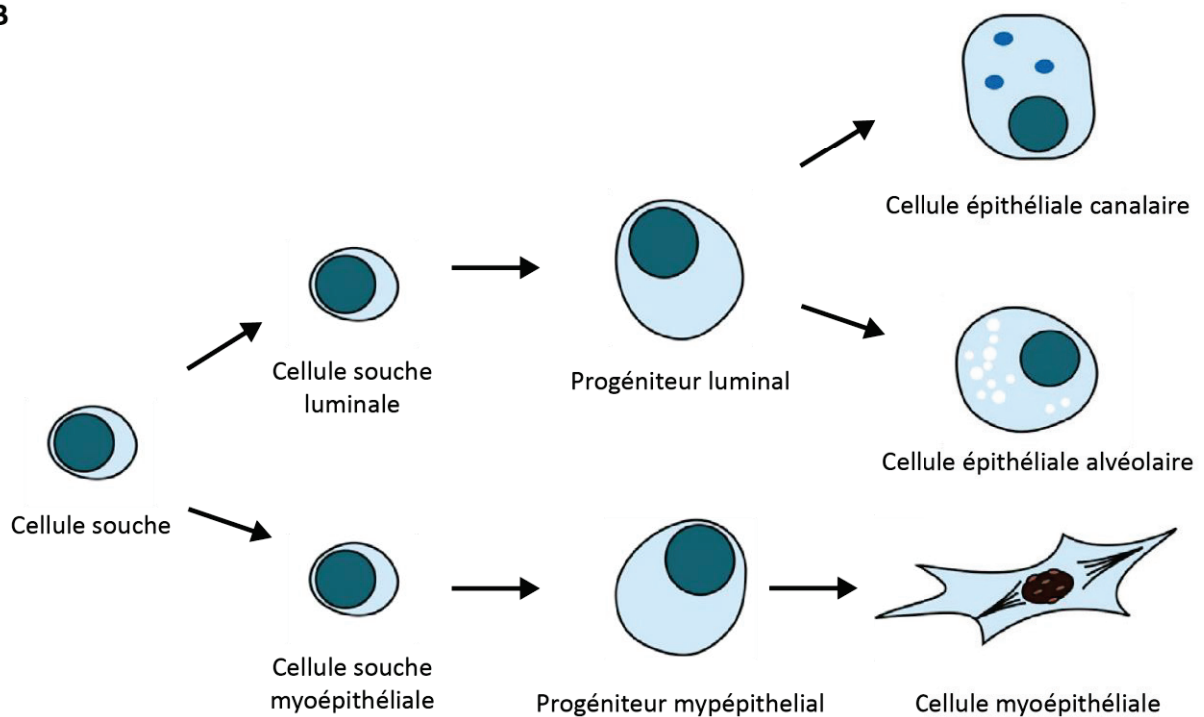
A**B**

Figure 2 | Schéma des deux modèles potentiels de la hiérarchie cellulaire mammaire.

(A) Des cellules souches multipotentes donnent naissance à un progéniteur commun qui lui-même engendrerait les progéniteurs luminaux et basaux et ainsi les différentes populations mammaires. (B) Plus récemment, des études suggèrent que les MaSCs n'existeraient qu'à l'état embryonnaire mais qu'après la naissance, des cellules souches unipotentes seraient responsables du développement adulte de la glande. Deux types de cellules souches unipotentes (luminale et myoépithéliale) engendreraient l'ensemble des populations mammaires.

Les œstrogènes et la progestérone sont aussi impliqués dans la régulation des MaSCs et stimulent leur activité (Asselin-Labat et al., 2010). Une ovariectomie diminue le nombre de MaSCs et leur croissance *in vivo*, alors que leur activité est augmentée chez les souris traitées avec des œstrogènes et de la progestérone. Bien qu'elles n'expriment pas les RO et RP, les cellules basales reçoivent des signaux paracrines des cellules luminales qui les expriment. Notamment, le ligand de NF- κ B, RANKL (receptor activator of Nuclear Factor - kappa B ligand), une cible des récepteurs à la progestérone, sert de transmetteur en induisant la prolifération des cellules basales (Fernandez-Valdivia and Lydon, 2012).

- Modèles de ségrégation hiérarchique de l'épithélium mammaire

A partir des études de transplantation orthotopique et de traçage *in vivo* ainsi que des expériences de clonogénicité, deux modèles de ségrégation hiérarchique de l'épithélium mammaire ont été proposés et sont schématisés dans la Figure 2. Les études de transplantation suggèrent l'existence de cellules souches multipotentes de type basal à l'origine de tous les lignages mammaires (luminal, basal et myoépithélial) par l'intermédiaire de différents progéniteurs. Les progéniteurs myoépithéliaux seraient localisés au niveau basal tandis que les progéniteurs luminaux se trouveraient dans le compartiment luminal et donnent naissance aux cellules luminales canalaire et alvéolaires durant la gestation. Une élégante étude menée par Van Keymeulen et al. ont confirmé qu'un unique progéniteur basal embryonnaire bipotent ou multipotent (exprimant la kératine 14) donnait naissance au lignage luminal ($K8^+/K18^+$) et basal ($K5^+/K14^+$). Cependant, après la parturition et au cours de la vie postnatale, il apparaît que ces cellules progénitrices ne participeraient pas ou peu à la formation du compartiment luminal ; elles deviendraient unipotentes. Deux types de cellules souches (luminales et basales) ou encore des MaSCs bipotentes coexisteraient au sein de la glande mammaire et seraient à l'origine des différents lignages dans l'épithélium adulte (Rios et al., 2014), (pour articles de revue, (Visvader, 2009; Visvader and Lindeman, 2011)).

De nombreuses disparités existent dans la caractérisation moléculaire des cellules souches et leurs marqueurs varient encore d'une étude à l'autre. Cette caractérisation est encore incomplète et nécessite d'identifier de nouveaux marqueurs stables et reproductibles afin d'affiner le modèle d'organisation hiérarchique de l'épithélium mammaire. La compréhension des voies de signalisation cellulaire et des régulations moléculaires sous-tendant à cette hiérarchie devait permettre de découvrir de nouvelles caractéristiques propres aux cellules souches/progénitrices mammaires.

II.3. L'environnement de la glande mammaire

L'environnement de la glande mammaire est appelé stroma et il représente 80% du volume de la glande mammaire (Drife, 1986). Le stroma contient les différents composants de la matrice extracellulaire et est composé majoritairement d'adipocytes et de fibroblastes (en quantité variable en fonction de l'âge et de la période d'activité génitale), mais aussi de cellules immunitaires dont les macrophages, des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Chez la souris, chaque glande contient au moins un ganglion lymphatique. Le stroma mammaire est donc un tissu conjonctif de soutien et sa composante adipeuse permet de protéger la glande en donnant un volume au sein. D'autre part, il fournit des nutriments et les défenses immunitaires à l'épithélium. Ses interactions avec les cellules épithéliales sont donc essentielles. Elles régulent la croissance mammaire et la différenciation alvéolaire durant l'embryogenèse et le développement post-natal de la glande (pour articles de revue, (Robinson, 2007; Maller et al., 2010; Muschler and Streuli, 2010)).

Il existe des différences notables entre le stroma des glandes mammaires murines et humaines : chez la souris, le coussin adipeux possède moins de tissu conjonctif mais cependant présente plus d'adipocytes (qui explique sa dénomination) que la glande mammaire humaine. D'autre part, chez la femme, le stroma inter-lobulaire est très fibreux et le stroma intra-lobulaire entourant les alvéoles est très lâche alors qu'il est beaucoup plus homogène chez la souris (pour article de revue, (Richert et al., 2000)).

La matrice extracellulaire (MEC) est réseau tridimensionnel complexe de nombreux types de collagènes, de la fibronectine et des protéoglycanes. Elle est synthétisée par de nombreux types cellulaires : les cellules épithéliales et myoépithéliales, les fibroblastes, les adipocytes, les cellules endothéliales et enfin les cellules immunitaires. On distingue trois types de matrice (pour article de revue, (Maller et al., 2010)) :

- (1) La matrice basale, structure très spécialisée, qui est en contact direct avec les cellules épithéliales mammaires, est constituée majoritairement par du collagène IV et de la laminine. La matrice basale est principalement synthétisée par les cellules myoépithéliales ;
- (2) le stroma intra et inter-lobulaire (respectivement adjacents aux lobules et alvéoles) est majoritairement constitué de fibres de collagène et de fibronectine ;
- (3) le tissu fibreux connectif est caractérisé par la présence de fibres élastiques.

L'environnement de la glande mammaire est donc complexe et indispensable à son développement et son bon fonctionnement.

III. Développement de la glande mammaire

La glande mammaire est un organe très plastique qui n'est que très peu développé à la naissance. Son développement a lieu majoritairement durant la puberté. Pendant la gestation, plusieurs cycles d'intense prolifération sont observés et ceux-ci sont suivis d'une apoptose massive du tissu mammaire lors du sevrage des nouveau-nés. Ainsi, le développement de la glande mammaire peut être divisé en trois grandes étapes : embryonnaire, pubertaire et adulte.

III.1. La glande mammaire embryonnaire et fœtale

A partir de la sixième semaine de vie embryonnaire humaine et du 10,5^e jour de vie embryonnaire murine, les glandes mammaires développent à partir de l'ectoderme. Deux crêtes ou lignes mammaires (des épaissements longitudinaux de l'ectoderme) se développent de chaque côté de la face ventrale de l'embryon et donnent naissance avant de disparaître à des bourgeons mammaires primitifs, les placodes. Ces derniers sont symétriques et peuvent être inguinaux, abdominaux, pectoraux ou encore axillaires en fonction des espèces. Les bourgeons vont alors s'invaginer dans les profondeurs du derme formant des prolongements qui constituent l'ébauche des canaux galactophores et qui finiront par se creuser d'une lumière et se ramifier. Ces différentes étapes du développement embryonnaire murin sont récapitulées dans la Figure 3. Le développement des glandes mammaires chez les mâles est similaire jusqu'au début de la production d'androgène à 13 jours de vie embryonnaire murine. Le volume des glandes diminue et l'épithélium rudimentaire se détache alors de l'épiderme (pour articles de revue, (Richert et al., 2000; Robinson, 2007; Hassiotou and Geddes, 2013)).

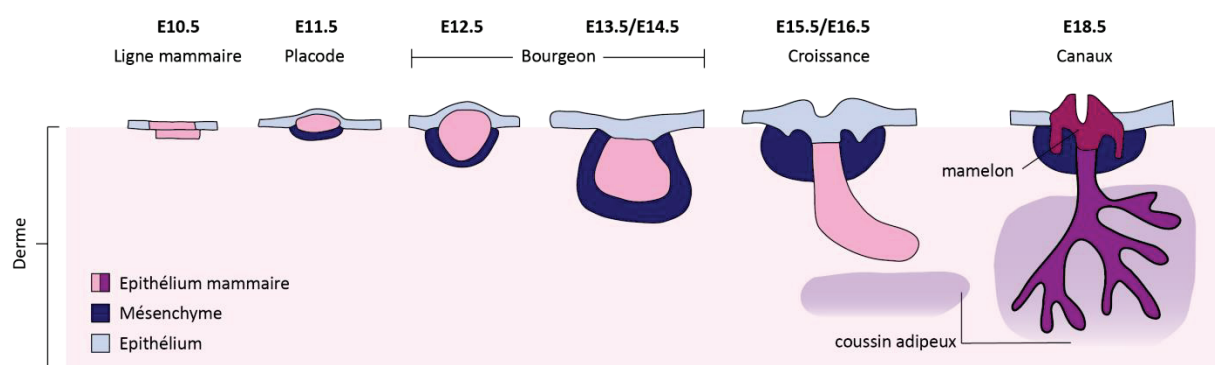


Figure 3 | Les différentes étapes du développement embryonnaire.

A E10.5, les crêtes mammaires apparaissent et donnent naissance à des placodes. Des bourgeons vont alors s'invaginer dans le derme et former les ébauches des canaux qui finiront par se creuser d'une lumière et se ramifier pour former un réseau rudimentaire de canaux galactophores immerger dans le coussin adipeux (adapté de (Robinson, 2007)).

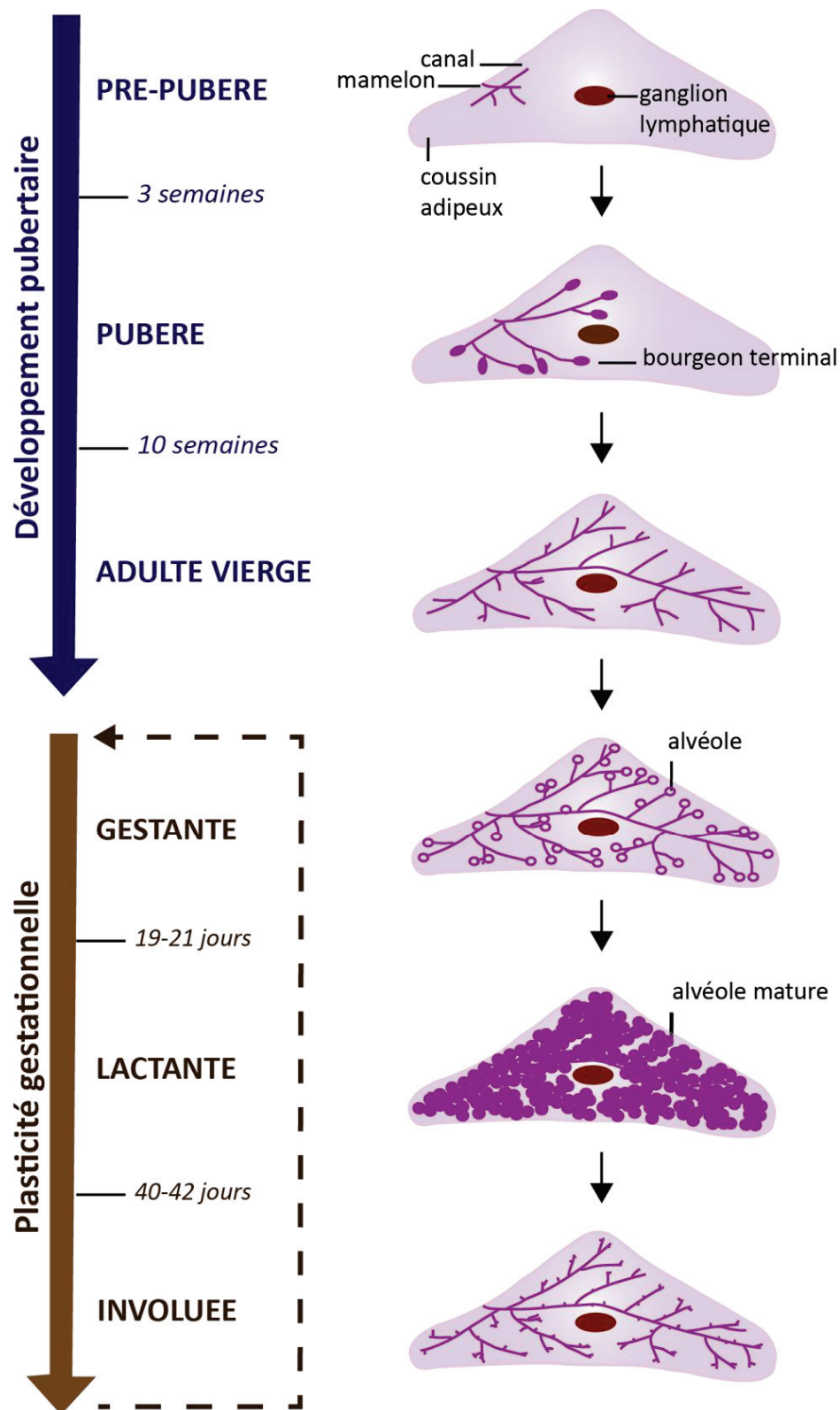


Figure 4 | Les différentes étapes du développement de la glande mammaire murine.

N'étant que très peu développée à la naissance, la glande mammaire va se développer majoritairement au cours de la puberté sous l'influence des hormones. Des bourgeons terminaux vont proliférer et envahir le stroma environnant : c'est le développement pubertaire. Durant la gestation, la glande mammaire possède une plasticité qui va lui permettre de développer des structures, les alvéoles, qui seront capables de produire et sécréter du lait durant la lactation. Lors du sevrage, la glande involuera avant un autre potentiel cycle de gestation-lactation-involution.

Cette étape du développement mammaire est indépendante des régulations hormonales mais la voie WNT (wingless-type MMTV integration site family) et les facteurs de croissance FGFs (fibroblast growth factor), notamment IGF-1 (insulin growth factor 1), sont impliqués à la fois dans la formation des crêtes mammaires mais aussi des placodes mammaires au cours du développement embryonnaire (pour articles de revue, (Robinson, 2007; Briskin and O'Malley, 2010)). La communication entre mésenchyme et épithélium est aussi primordiale pour l'acquisition de leurs identités cellulaires respectives. Notamment, la sécrétion par le mésenchyme de FGF10 qui interagit avec son récepteur FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) localisé sur les cellules épithéliales permet la formation des placodes mammaires.

A la naissance, la glande mammaire est composée d'un réseau rudimentaire de canaux galactophores, et restera quiescente jusqu'à la puberté chez les femmes. Chez les hommes, la glande mammaire est similaire à la glande mammaire féminine jusqu'à la puberté mais reste quiescente tout au long de leur vie.

III.2. Le développement pubertaire de la glande mammaire

La majeure partie du développement de la glande mammaire a lieu durant la puberté et chez la femme adulte. Les différentes étapes de son développement sont schématisées dans la Figure 4 en prenant l'exemple du développement murin. Avec le début de la puberté et de la sécrétion d'hormones ovariennes, la glande mammaire débute son développement postnatal. C'est une période de forte croissance où les canaux galactophores prolifèrent et envahissent le tissu environnant (pour article de revue, (Macias and Hinck, 2012)).

Chez la souris, c'est au niveau de l'extrémité distale des canaux galactophores, qu'on appelle bourgeon terminal, qu'a lieu l'élongation canalaire (Visvader, 2009). Plusieurs TEBs se forment et prolifèrent dans le coussin adipeux donnant naissance par ramification et bifurcation à des structures secondaires. C'est un lieu de haute prolifération. Ces TEBs disparaissent lorsqu'ils entrent en contact avec les limites du coussin adipeux environnant. Ils sont composés :

- (1) d'une couche de cellules externes, dites cellules de la coiffe. Elles permettent la dégradation du coussin adipeux en synthétisant des métalloprotéases, et sont les précurseurs des cellules myoépithéliales ;
- (2) d'une multi-couche de cellules internes, dites les cellules du corps du bourgeon, qui prolifèrent et donnent naissance aux cellules luminales.

Les TEBs vont finalement subir un phénomène d'apoptose massive permettant la formation de la lumière des canaux (cavitation).

Contrairement à son développement embryonnaire qui est indépendant des régulations hormonales, la glande mammaire se développe sous l'influence des œstrogènes et l'hormone de croissance et, dans une moindre mesure de la progestérone (pour article de revue, (Briskin and O'Malley, 2010)). Les œstrogènes sont indispensables à la différenciation de l'épithélium (Forster et al., 2002) mais aussi à l'élongation et la croissance canalaire pendant la puberté (Bocchinfuso et al., 2000). Elles entraînent notamment l'activation de la voie EGF (epidermal growth factor), les hormones de croissance stimulent la production de IGF-1, favorisant l'élongation canalaire. Enfin, à la fin de la puberté, la progestérone induit la formation de branchements latéraux (Atwood et al., 2000).

A la fin de la période pubertaire, la glande mammaire est composée d'un réseau ramifié mature constitué de multiples lobes et canaux galactophores. Au cours de chaque cycle œstral murin et cycle menstruel féminin, des bourgeons tertiaires latéraux et alvéolaires rudimentaires se forment qui se différencieront complètement durant la gestation afin de sécréter du lait (Robinson et al., 1995; Andres and Strange, 1999).

III.3. La plasticité gestationnelle de la glande mammaire

Dès le début de la grossesse, on observe une forte croissance du tissu mammaire épithélial. Ce sont les progéniteurs et les MaSCs qui prolifèrent massivement entraînant l'élongation et la ramification des canaux galactophores ainsi que la formation de structures alvéolaires à leurs extrémités qui se différencieront en fin de grossesse avant d'être fonctionnelles durant la lactation (Figure 4). Cette étape est essentielle à l'accomplissement des fonctions de la glande mammaire (pour article de revue, (Macias and Hinck, 2012)).

Avant la parturition, les cellules sécrétrices mammaires ont déjà commencé à sécréter des protéines de lait et des lipides (Mather and Keenan, 1998). Le lait sécrété durant la lactation par ces dernières sera acheminé par les canaux galactophores jusqu'au mamelon, sous l'action de l'activité contractile des cellules myoépithéliales les bordant. C'est l'ocytocine, sécrétée par l'hypothalamus, qui stimule la contraction des cellules myoépithéliales (Gimpl and Fahrenholz, 2001). Lors de l'arrêt de la stimulation des mamelons par la succion des nouveau-nés - par sevrage ou naturellement - les alvéoles involuent et le tissu mammaire subit une apoptose massive et un remodelage (Balogh et al., 2006; Watson, 2006). Il s'atrophie, bien que quelques alvéoles persistent. La glande mammaire retrouve une morphologie pré-gestationnelle et elle pourra à nouveau être soumise à d'autres cycles de gestation/lactation/involution.

A la ménopause, on observe une involution ou atrophie majeure du tissu glandulaire, des canaux galactophores et aussi, dans une moindre mesure, du tissu adipeux. Les traitements

hormonaux substitutifs peuvent permettre d'inhiber les effets de la ménopause, néanmoins certaines études montrent qu'ils tendent à augmenter les risques de développement des cancers du sein (1997).

La gestation est sous l'influence de plusieurs hormones telles que la prolactine, les œstrogènes, la progestérone et des stéroïdes, mais des facteurs de transcriptions, kinases et récepteurs sont également impliqués (pour article de revue, (Briskin and O'Malley, 2010)). La progestérone et la prolactine jouent un rôle important dans la différenciation des lactocytes. La progestérone est nécessaire au développement alvéolaire des glandes pendant la première partie de la gestation et, durant la seconde moitié, la prolactine, en régulant la voie JAK/STAT (janus kinase/signal transducer and activator of transcription), conduit à la différenciation des cellules alvéolaires en lactocytes.

En conclusion, la glande mammaire est un organe qui n'est mature qu'à l'âge adulte, après une intense période de développement pubertaire. Elle est caractérisée par une forte plasticité qui lui permet, à plusieurs reprises au cours de la vie d'un mammifère, de subir de profonds changements morphologiques en lien avec sa fonction.

Chapitre 2. Les cancers du sein : généralités, classifications et traitements

Nous allons aborder l'épidémiologie et l'étiologie des cancers du sein. L'épidémiologie des cancers du sein s'intéresse aux facteurs influençant l'apparition des cancers en étudiant particulièrement leur distribution, leur fréquence et leur évolution/gravité. L'étiologie des cancers du sein permet d'étudier les causes et donc l'origine de ces pathologies. Les diverses classifications utilisées pour hiérarchiser l'hétérogénéité des cancers du sein seront aussi développées ainsi que, brièvement, les thérapies majeures existantes.

I. Épidémiologie des cancers du sein

I.1. Incidence des cancers du sein

Avec plus de 1.67 million de nouveaux cas à l'échelle mondiale en 2012, le cancer du sein est le second cancer le plus fréquent et représente à l'heure actuelle un problème majeur de santé publique (Organisation Mondiale de la Santé). Il est aujourd'hui le cancer le plus diagnostiqué chez les femmes dans les pays industrialisés, mais aussi dans les pays en développement (16% de l'ensemble des cancers féminins). En France métropolitaine, où 48 764 nouveaux cas ont été recensés en 2012, les cancers du sein représentent 31.5% de l'ensemble des cancers féminins devant les cancers colorectaux et les cancers des poumons (qui représentent respectivement 12.2% et 7.3%) (Institut National du Cancer).

Une grande disparité de l'incidence des cancers du sein existe à l'échelle mondiale. Dans les pays les plus développés, les taux d'incidence sont jusqu'à quatre fois plus élevés que dans les pays moins développés (Figure 5 et 6). Alors qu'on observe plus de 80 nouveaux cas pour 100 000 femmes par an dans les pays développés (à l'exception du Japon), moins de 40 nouveaux cas pour 100 000 femmes par an sont diagnostiqués en Afrique centrale et en Asie de l'Est. Une étude a montré que des femmes asiatiques migrant vers des pays occidentaux atteignaient, en quelques générations seulement, un taux d'incidence similaire à leur pays d'adoption (Maskarinec and Noh, 2004) démontrant que ces différences sont principalement d'origines environnementales et non génétiques. Elles seraient en partie dues aux régimes alimentaires différenciés associées à des premières grossesses plus tardives, à des grossesses moins nombreuses, et à des durées d'allaitement plus courtes dans les pays les plus développés (Pike et al., 1983; Newcomb et al., 1994; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, 2002).

L'incidence des cancers du sein augmente depuis les années 1980 dans tous les pays du monde (Figure 7). Plusieurs facteurs peuvent l'expliquer notamment l'augmentation de la population à risque (les femmes de 50 ans ou plus) consécutive au vieillissement de la population, mais aussi

l'amélioration des méthodes de détection. Dans les pays moins développés, l'augmentation de l'incidence pourrait s'expliquer par l'adoption progressive de modes de vie plus occidentaux.

International Agency for Research on Cancer



World Health
Organization

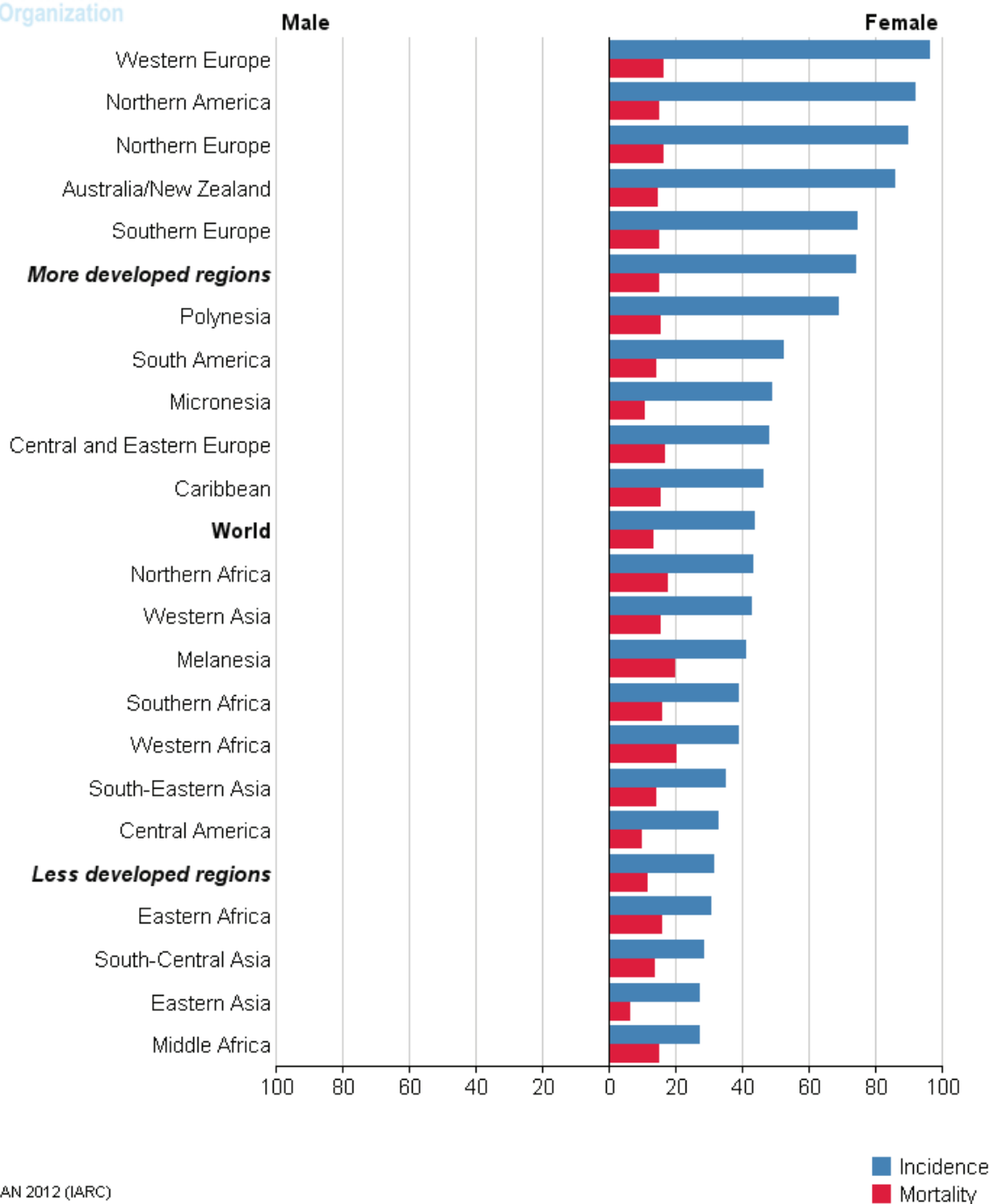


Figure 5 | Incidence (bleu) et mortalité (rouge) mondiales des cancers du sein estimées en 2012 (OMS).
Nombres pour 100 000 habitants en 2008 (Ferlay et al., 2010).

I.2. Mortalité des cancers du sein

Le cancer du sein représente le cinquième cancer le plus mortel avec 522 000 décès par an à l'échelle mondiale et 11 886 décès en France métropolitaine en 2012 (Organisation Mondiale de la Santé et Institut National du Cancer). C'est le cancer le plus mortel dans les pays en développement et la seconde cause de décès par cancer dans les pays développés après les cancers des poumons. En France, les cancers du sein entraînent 18.8% des décès devant les cancers colorectaux et les cancers des poumons qui représentent respectivement 13.4% et 13.7% de l'ensemble des décès par cancer (Institut National du Cancer).

Il existe des différences mineures dans les taux de mortalité entre pays développés et pays moins développés (Figures 5 et 6). Compte tenu de la faible incidence des cancers du sein dans les pays moins développés, la mortalité y est donc relativement beaucoup plus élevée. Ceci s'explique notamment par le manque d'accès aux soins dont souffrent ces pays, qui entraîne une détection tardive à des stades avancés de la maladie, et un déficit d'accès aux traitements, diminuant le taux de survie des femmes atteintes.

Les taux de mortalité ont fortement diminué depuis 1975 dans les pays les plus développés grâce aux progrès thérapeutiques (traitements adjuvants plus efficaces) mais aussi à la détection précoce des cancers, contrairement aux pays moins développés qui n'ont que peu ou pas accès aux infrastructures nécessaires (Figure 7).

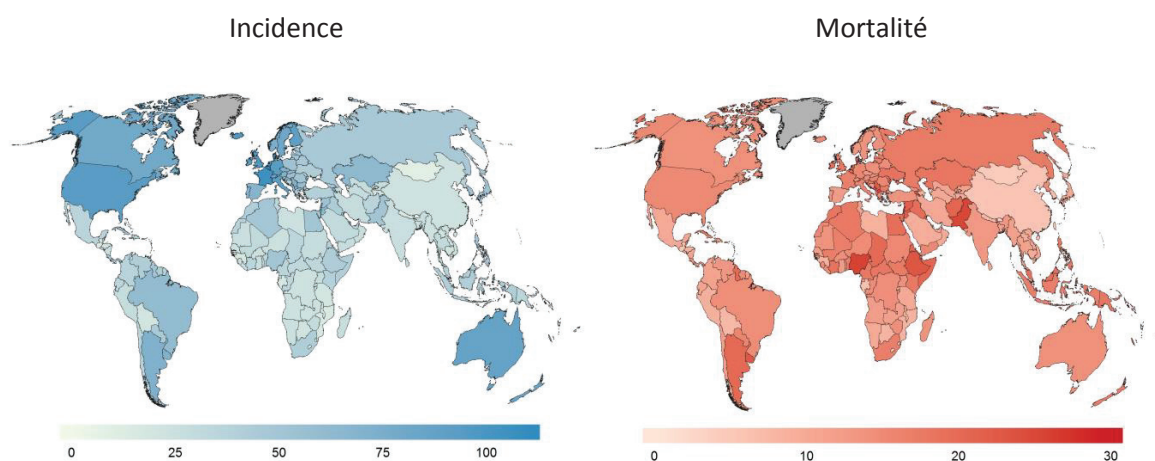


Figure 6 | Incidence (bleu) et mortalité (rouge) mondiales des cancers du sein estimées en 2012 (OMS). Nombres pour 100 000 habitants en 2008 (Ferlay et al., 2010).

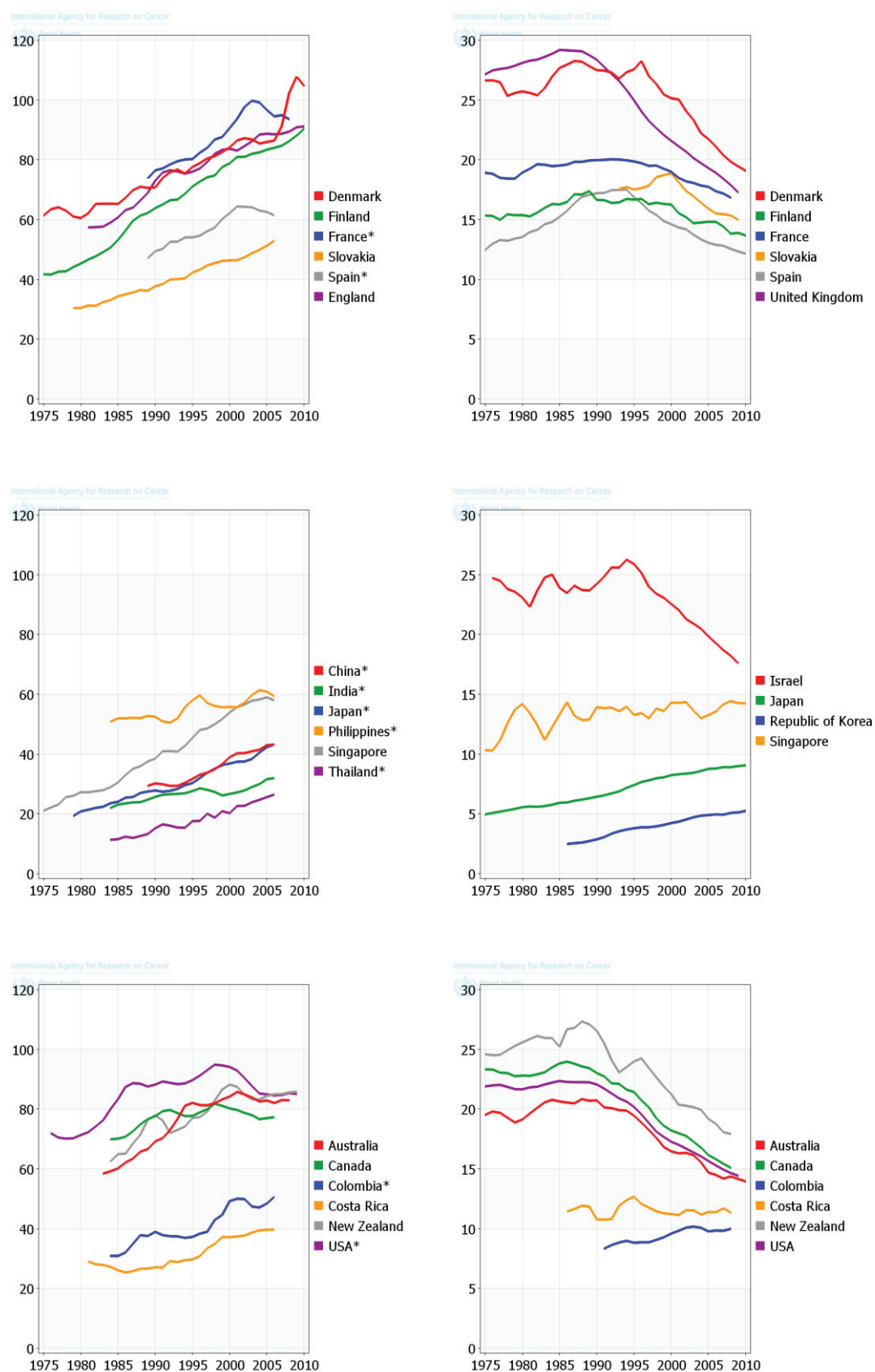


Figure 7 | Evolution de l'incidence (gauche) et de la mortalité (droite) des cancers du sein dans différents pays depuis 1975 (OMS). Nombres pour 100 000 habitants en 2008 (Ferley et al 2010).

II. Étiologie du cancer du sein

De nombreuses études scientifiques s'intéressent à l'étiologie très complexe et diverse des cancers du sein. Elles ont permis d'établir que la majorité des cancers, soit plus de 85%, a une origine sporadique avec une multitude de facteurs de risques impliqués. Une minorité des cancers, de 5 à 10%, a une origine héréditaire avec un contexte familial. Enfin, un très faible pourcentage est dû à des prédispositions génétiques sans contexte familial. Toutefois, hormis les origines génétiques, aucun facteur de risque, excepté le sexe et l'âge, n'est clairement identifié chez la plupart des patientes. L'ensemble de ces facteurs est répertorié dans la Table 1.

RISQUE RELATIF	FACTEUR
FORT	<ul style="list-style-type: none"> • Age • Prédispositions génétiques • Densité en mammographie • Antécédent familial 1^{er} degré
MOYEN	<ul style="list-style-type: none"> • Antécédent familial 2^{ème} degré • Radiations • Premier cancer du sein
FAIBLE	<ul style="list-style-type: none"> • Puberté précoce • Ménopause tardive • Absence de grossesse • Grossesse tardive • Alimentation • Alcool • Surpoids/obésité

Table 1 | Tableau récapitulant les facteurs de risque du cancer du sein.

II.1. Facteurs de risques environnementaux et comportementaux

Sexe féminin. Le cancer du sein touche majoritairement les femmes alors que seulement 1% des cancers du sein apparaissent chez les hommes. On estime l'incidence des cancers du sein chez ces derniers à 1 pour 100 000 en Europe (Sasco et al., 1993).

Vieillessement. L'incidence des cancers du sein augmente avec l'âge (Pike et al., 1983). 75% des cancers du sein se développant après 50 ans contre seulement 10% avant 35 ans. De plus, l'âge est un facteur aggravant. En effet, les cancers qui se développent chez les femmes jeunes sont généralement plus agressifs.

Antécédent personnel du cancer. Avoir eu un cancer du sein augmente les risques de développer un cancer à l'autre sein (Schacht et al., 2014).

Certaines lésions histologiques dites « à risque » du sein. Le degré de risque varie en fonction du type de lésion ; les hyperplasies atypiques canalaire ou lobulaires étant les lésions associées au plus fort risque (London et al., 1992; Hartmann et al., 2005).

Densité en mammographie. C'est un risque important de cancer du sein qui est influencé par de nombreux facteurs comme l'âge, le statut ménopausique, la grossesse, les facteurs génétiques (Byrne et al., 1995; Tamimi et al., 2007). De plus, la densité mammaire complique le dépistage de cancer du sein par mammographie.

Intensité/durée d'exposition de la glande mammaire aux œstrogènes. Avoir eu une puberté précoce (avant 12 ans par rapport à après 14 ans) ou encore une ménopause tardive (après 54 ans en comparaison d'avant 45 ans), accroient sensiblement le risque de développer un cancer du sein (Kelsey et al., 1993). Chez les femmes préménopausées, le risque de cancer du sein augmente avec les niveaux d'expression des stéroïdes sexuels sanguins (Tamimi et al., 2007; Endogenous et al., 2013).

Parité. Avoir eu une première grossesse tardive (après 29 ans par rapport à avant 20 ans) ou une absence de grossesse augmentent sensiblement le risque de développer un cancer du sein tandis que la multiparité et l'allaitement pourraient avoir un rôle protecteur (Kelsey et al., 1993; Lacey et al., 2009).

Hormones exogènes. Les traitements hormonaux substitutifs pour les femmes ménopausées augmenteraient sensiblement le risque de développer des cancers du sein, néanmoins ce risque est différent d'un type de traitement à l'autre, et l'augmentation du risque s'accroît avec la durée du traitement (1997).

Surpoids et obésité. Chez les femmes ménopausées, le risque de cancer du sein augmente avec le surpoids et l'obésité (La Vecchia et al., 2011).

Alimentation. De nombreuses études se sont intéressées aux associations entre alimentation et cancer du sein, sans trouver de relation évidente mais il semblerait qu'une alimentation riche en acides gras et saturés durant l'adolescence augmenterait le risque de cancer du sein (Linos et al., 2010).

Consommation d'alcool. Le risque augmente en fonction de la quantité totale d'alcool consommée (Smith-Warner et al., 1998).

Irradiations thoraciques. Un traitement par radiothérapie thoracique par exemple pour une maladie de Hodgkin augmente significativement le risque de développer un cancer (Tokunaga et al., 1987).

II.2. Facteurs de risques héréditaires

Certaines altérations génétiques héréditaires prédisposent au cancer du sein. Les premiers gènes confirmant cette association, *BRCA1* (breast cancer 1) et *BRCA2* (breast cancer 2), furent découverts dans les années quatre-vingt-dix (Miki et al., 1994; Wooster et al., 1994). Aujourd'hui, 5 à 10% des cancers sont attribués à des facteurs héréditaires avec une origine familiale, un très faible pourcentage présente des mutations sans contexte familial (Melchor and Benitez, 2013).

II.2.1. Généralités

Bien que des mutations dans certains gènes favorisent le développement de cancer du sein, le risque relatif de développer des cancers du sein varie en fonction des gènes impliqués. Un gène est dit à forte pénétrance lorsqu'une de ses mutations confère un risque relatif supérieur à 5 tandis que les gènes à faible pénétrance ont un risque relatif autour de 1.5 (les gènes à pénétrance intermédiaire se situant entre ces deux chiffres). La plupart de ces gènes sont impliqués dans les processus de dommage et/ou de réparation de l'ADN, processus indispensables au maintien de l'intégrité du génome.

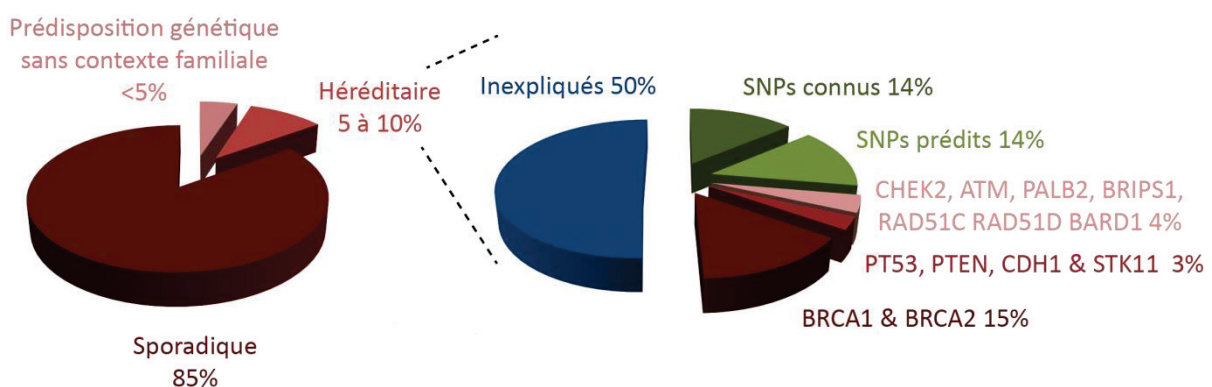


Figure 8 | Etiologie des cancers du sein.

Diagramme représentant la distribution des patientes atteintes d'un cancer du sein (à gauche) pour toutes les patientes atteintes d'un cancer du sein, et (à droite) pour les formes héréditaires uniquement (adapté de (Melchor and Benitez, 2013; Couch et al., 2014)).

Parmi les cancers dus à une origine familiale, 15% présentent des mutations dans les gènes *BRCA1* (Miki et al., 1994) et *BRCA2* (Wooster et al., 1994), des mutations dans ces deux gènes entraînent une forte susceptibilité aux cancers du sein mais aussi des ovaires (Figures 8 et 9). D'autres mutations à forte pénétrance dans les gènes *TP53* (transforming protein 53), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), *STK11* (serine/threonine kinase 11), et *CDH1* (cadherin 1, E-

cadherin) sont responsables d'environ 5% des cas familiaux. Des mutations ont été décrites dans d'autres gènes tels que *PALB2* (partner and localizer of BRCA2), *RAD51C* (RAD51 paralog C), *ATM* (ataxia telangiectasia mutated), *CHEK2* (checkpoint kinase 2) mais avec une pénétrance modérée. 50% sont classifiés dans la catégorie « inexpliqués » ou « BRCAx » et présentent une faible pénétrance. Dans ces familles, les mutations responsables restent à identifier (Melchor and Benitez, 2013).

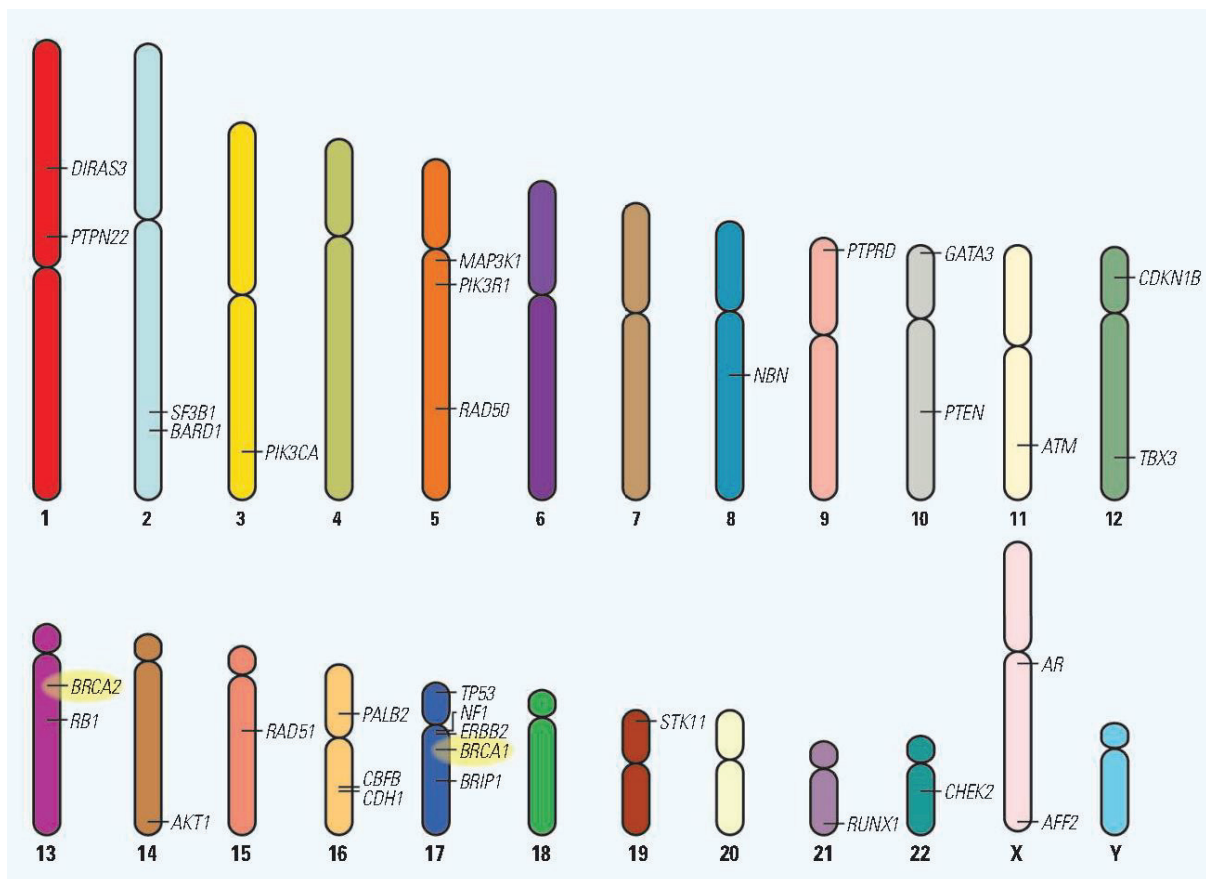


Figure 9 | Les gènes impliqués dans les cancers du sein héréditaires. De (Kean, 2014)).

L'étude de nouveaux facteurs de risques héréditaires devrait permettre de mieux définir les individus à risque important de développer un cancer du sein, et donc d'améliorer leur prise en charge.

II.2.2. Gènes *BRCA1* et *BRCA2*

Ces deux gènes suppresseurs de tumeurs ont été découverts dans les années quatre-vingt-dix et représentent 30% des cancers héréditaires et 25% des cancers familiaux. A 70 ans, 57% des porteuses de mutations *BRCA1* développeront un cancer du sein et 40% un cancer de l'ovaire, tandis que 49% des porteuses de *BRCA2* développeront un cancer du sein et 18% un cancer de l'ovaire (Chen and Parmigiani, 2007). Cependant, chez ces femmes porteuses de mutation *BRCA1/2*, il existe

une grande variabilité à la fois du risque tumoral mais aussi de l'âge au moment du diagnostic, et du type de cancer (sein et/ou ovaire) lorsqu'il se développe. Cette variabilité est observée entre des individus de différentes familles porteuses de ces mutations mais aussi entre des individus au sein d'une même famille. Ainsi, d'autres facteurs génétiques et environnementaux influencent l'apparition des cancers chez ces femmes. Parmi les facteurs génétiques, la localisation et le type de mutation présente dans la séquence de *BRCA1/2* modifient le risque de développer un cancer : des mutations dans la région centrale des gènes le diminuent alors qu'à l'inverse, des mutations dans les régions 5' et 3' l'augmenteraient. D'autre part, des gènes modificateurs du risque tumoral ont été identifiés chez les femmes porteuses de mutation *BRCA1/2* en réalisant des études d'association entre des potentiels modificateurs et les risques de cancer, les âges au diagnostic et le type de cancer (Kadouri et al., 2004; Antoniou et al., 2011; Rebbeck et al., 2011). Par exemple, le gène *AIB1*, un coactivateur des RE, qui est fréquemment amplifié dans les cancers du sein et de l'ovaire présente une répétition polymorphique de triplet CAG (Cytosine-Adénine-Guanine). Un nombre de répétitions supérieur à la moyenne est associé à une augmentation du risque de cancer chez les porteuses de mutation *BRCA1* alors qu'à l'inverse, un nombre de répétitions inférieur à la moyenne diminue le risque de cancer (Kadouri et al., 2004).

BRCA1, présent sur le chromosome 17q21, et *BRCA2* localisé sur le chromosome 13q12.3, présentent une légère homologie de séquence. Ils codent pour des protéines, respectivement de 1863 et 3418 acides aminés et s'expriment dans de nombreux tissus dont le sein et les ovaires mais aussi le thymus, la rate (pour article de revue, (Narod and Foulkes, 2004)).

BRCA1 est impliqué dans les processus de réparation de l'ADN, de remodelage de la chromatine, de régulation du cycle cellulaire et de contrôle de la transcription. Cette protéine multifonctionnelle interagit avec de nombreux facteurs de transcription, tels que P53, les RH (récepteurs hormonaux), c-Myc et régule ainsi leur transcription (Wang et al., 1998 ; Zhang et al., 1998 ; Zheng et al., 2001). Elle présente plusieurs domaines fonctionnels. Dans sa partie N-terminale, un domaine RING lui permet d'interagir avec BARD1 (*BRCA1* associated ring domain 1) (Wu et al., 1996). *BRCA1* présente deux signaux de localisation nucléaire (NLS, nuclear localization signal), un domaine d'interaction à l'ADN, plusieurs séquences SQ (séquences de serine et thréonine), et deux domaines BRCT dans sa région C-terminale impliqué dans la réparation de l'ADN (pour article de revue, (Narod and Foulkes, 2004)).

Les fonctions de *BRCA2*, qui ont été principalement décrites dans les phénomènes de recombinaison homologue et de régulation de la transcription, sont beaucoup moins connues. *BRCA2* présente notamment 8 répétitions de motifs BRC dans sa région centrale, ce qui lui permet d'interagir avec son partenaire RAD51, une ADN recombinase (Wong et al., 1997). Au cours de la méiose, l'association de *BRCA2* avec RAD51 régule les processus de recombinaison homologue et

ainsi, la réparation des dommages de l'ADN (pour article de revue, (Jasin, 2002)). BRCA2 interagit aussi avec l'ADN, par sa région C-terminale et avec certains facteurs de transcription tels que SMAD3 (SMAD family member 3) (Preobrazhenska et al., 2002; Yang et al., 2002).

Plus de 2000 mutations sur ces gènes ont été décrites. Ces mutations (délétions, insertions et substitutions de nucléotides) entraînent généralement la formation de protéine tronquée ou bien l'altération de domaine fonctionnel essentiel pour leurs activités (pour article de revue, (Narod and Foulkes, 2004)).

Les cancers associés à des mutations *BRCA1* sont généralement de type agressif et de type basal (Table 2 ; voir Chap.2, III.4.3 ; pour article de revue, (Narod and Foulkes, 2004)). Les cancers du sein *BRCA1* sont en majorité de haut grade, n'expriment pas les RE et ne présentent pas de surexpression de HER2 (human epidermal growth factor receptor 2). Les cancers *BRCA2* sont plus volontiers de type luminal, de grade intermédiaire ou haut et expriment les RE. Afin de réduire les risques de cancer chez les femmes porteuses d'une mutation, elles sont soumises à un dépistage régulier des cancers. Pour certaines patientes, des chirurgies prophylactiques (mastectomie totale ou oophorectomie) ou encore une hormonothérapie seront prescrites.

PHENOTYPE	BRCA1	BRCA2
HISTOLOGIE	canalaire, de type non spécifique (75%)	canalaire, de type non spécifique (75%)
GRADE SBR	haut (grade 3, 75%)	intermédiaire (grade 2, 45%) haut (grade 3, 45%)
RE	négatifs (75%)	positifs (75%)
HER2	négatif (95%)	négatif (95%)
P53	positive (50%)	positive (40%)

Table 2 | Tableau récapitulant certaines caractéristiques pathologiques des cancers associés à *BRCA1* et *BRCA2*. Adapté de (Narod and Foulkes, 2004)).

II.2.3. Autres prédispositions à forte pénétrance

TP53 est un gène suppresseur de tumeur associé au syndrome de Li-Fraumeni, caractérisé par une prédisposition très importante (90%) à une grande variété de cancers. Parmi les porteuses d'une mutation *TP53*, les cancers du sein sont les plus fréquemment développés (Gonzalez et al., 2009).

PTEN est lui aussi un gène suppresseur de tumeur. Les individus porteurs d'une mutation *PTEN* présentent un haut risque de développer des cancers de la thyroïde, du sein et de l'endomètre (Li et al., 1997).

CDH1 est le gène codant pour la protéine des jonctions adhérentes, la E-cadhérine, présente dans les cellules épithéliales. Des mutations germinales du gène *CDH1* sont associées à un risque plus important de cancer du sein lobulaire (40%) et de cancer gastrique (Pharoah et al., 2001).

III. Trier l'hétérogénéité intertumorale : classifications des cancers du sein

Les cancers du sein dérivent des cellules épithéliales glandulaires et sont donc appelés adénocarcinomes. Ils ne sont plus vus aujourd'hui comme une seule et unique pathologie mais comme des maladies très hétérogènes que ce soit au niveau biologique ou au niveau clinique, composées d'une collection de différentes maladies. Cette hétérogénéité a naturellement entraîné le développement de systèmes de classification des cancers du sein à valeur prédictive pour aider au traitement et au pronostic.

III. 1. La classification histologique

L'histologie des tumeurs étudie les aspects morphologiques des cellules tumorales et de leur environnement. La classification histologique des tumeurs mammaires permet de les classer selon des caractéristiques histologiques communes, définies à l'échelle internationale par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Table 3).

Au début de la progression tumorale, les cellules carcinomateuses prolifèrent dans un canal entouré d'une membrane basale intacte. La maladie est à ce stade restreinte au tissu mammaire sans risque de décès pour la patiente et est alors dénommée carcinome *in situ* (dans son organe d'origine ; de la locution latine, *sur place*). Dans la majorité des cas (80%), la membrane basale est détruite, permettant aux cellules cancéreuses de quitter la tumeur afin de métastaser dans des organes secondaires, mettant en jeu la vie de la patiente. Ces carcinomes sont appelés invasifs ou infiltrants.

III.1.1. Les carcinomes *in situ*

Les carcinomes *in situ* sont subdivisés en carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS), carcinomes canaux *in situ* (CCIS). Les CCIS sont plus nombreux et hétérogènes que les CLIS et sont sous-divisés en trois grades nucléaires (bas, intermédiaire et haut). Ils sont également classés en fonction de leurs caractéristiques architecturales : micropapillaire, papillaire, solide, cribriforme... Les CCIS présentent néanmoins peu de variations histologiques par comparaison à la grande diversité des cancers infiltrants. Il est à noter que la dénomination canalaire ou lobulaire des carcinomes ne reflète pas leur site anatomique d'origine (les canaux ou les lobules) (Wellings and Jensen, 1973; Wellings et al., 1975) mais correspondent aux noms donnés historiquement par les pathologistes qui les ont décrits. Les CLIS ont longtemps été considérés comme des facteurs de risque de cancer du sein plutôt que comme des précurseurs directs. Ils sont souvent bilatéraux et les cellules tumorales sont caractérisées par une forme ronde et une petite taille. Toutefois, les CLIS sont retrouvés associés aux lésions lobulaires infiltrantes dans 80 à 90% des cas.

Les carcinomes microinfiltrants sont des carcinomes canaux *in situ* associés à la présence de foyers infiltrants, adjacents à la composante *in situ*, mais n'excédant pas 1 mm de diamètre, quel que soit le nombre de foyers. Leur potentiel évolutif (histoire naturelle) est mal connu mais leur comportement clinique est plus proche de celui des *in situ* que des infiltrants.

III.1.2. Les carcinomes infiltrants

Les carcinomes infiltrants sont des entités très hétérogènes. Les plus communs d'entre eux sont les carcinomes infiltrants de types non spécifiques (canaux TNS) (pour article de revue, (Weigelt et al., 2010)). Ils ne possèdent pas des caractéristiques qui leur permettent d'être classifiés d'un sous-type spécifique particulier et sont donc dénommés de types non spécifiques par exclusion. L'OMS reconnaît aujourd'hui l'existence de plus de 20 sous-types histologiques spécifiques (Yerushalmi et al., 2009) tels que les lobulaires (10-15%), les tubuleux, les mucineux, les médullaires et les papillaires, listés dans la Table 3.

Parmi eux, les carcinomes lobulaires infiltrants (CLI) sont constitués de petites cellules non cohésives qui s'organisent en file indienne. Ils sont caractérisés par la perte de E-cadhérine (De Leeuw et al., 1997).

Carcinome <i>In situ</i>
Canalaire
Lobulaire
Microinfiltrant
Carcinome Infiltrant
<i>Types fréquents</i>
Infiltrant de type non spécifique (canalaire TNS)
Lobulaire infiltrant
Tubuleux
Cribriforme
Mucineux
Avec aspects médullaires
Avec différenciation apocrine
A cellules en bague à chaton
Micropapillaire infiltrant
Métaplasique
<i>Types rares et exceptionnels/variants</i>
Avec différenciation neuroendocrine
Sécrétant (juvénile)
Papillaire infiltrant
A cellules acineuses
Muco-épidermoïde
Polymorphe
Oncocytaire
A cellules riches en lipides
A cellules claires (riches en glycogène)
Sébacé
De types annexes de la peau/glandes salivaires
Adénoïde kystique

Table 3 | Classification histologique du cancer du sein établie par l'OMS révisée en 2012.

III.2. La classification TNM

L'Union Internationale du Cancer (UICC) s'appuie sur la classification TNM pour décrire l'étendue anatomique des cancers du sein (Table 4).

La lettre T désigne la tumeur primaire et caractérise sa taille avec un score allant de 0 à 4. La lettre N désigne les ganglions lymphatiques régionaux, leur absence (0) ou leur nombre (1 à plus de 10). La lettre M indique la présence ou l'absence de métastases distantes. Après avoir déterminé ces trois composantes, on peut classer la tumeur selon son stade tumoral allant de 0 à IV.

Pour chaque patiente, on distingue le TNM clinique pré-thérapeutique (ou TNMc) qui s'appuie sur des données avant traitement lors de l'examen clinique, du TNM issu de l'examen pathologique (pTNM) après examen de la biopsie, qui peut aider au choix du traitement adjuvant et donner des indications pronostiques.

T : Tumeur primaire				
Tx		La tumeur primitive ne peut pas être évaluée		
T0		La tumeur primitive n'est pas palpable		
T1		Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension		
T2		2 cm < tumeur ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension		
T3		Tumeur > 5 cm dans sa plus grande dimension		
T4		Tumeur, quelle que soit sa taille avec une extension directe soit à la paroi thoracique (a), soit à la peau (b)		
pN : Ganglions lymphatiques régionaux				
Nx		L'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué		
N0		Absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique et absence d'examen complémentaire à la recherche de cellules tumorales isolées		
N1mi		Micrométastases > 0.2 mm et ≤ 2 mm		
N1		Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou/et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique		
N2		Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire		
N3		Envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires (niveau III axillaire) ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux		
M : Métastases à distance				
Mx		Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance		
M0		Absence de métastase à distance		
M1		Présence de métastase(s) à distance		
Stade tumoral				
Stade 0		Tis	N0	M0
Stade I		T1	N0	M0
Stade II	IIA	T0	N1	M0
		T1	N1	M0
		T2	N0	M0
	IIB	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
		T0	N2	M0
Stade III	IIIA	T1	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1	M0
	IIIB	T3	N2	M0
		T4	N0	M0
		T4	N1	M0
		T4	N2	M0
	IIIC	Tous T	N3	M0
		Tous T	Tous N	M1
Stade IV		Tous T	Tous N	M1

Table 4 | Classification TNM du cancer du sein et stade tumoral établie par l'UICC révisée en 2010 (7ème édition)

III.3. Le grade SBR ou grade histopronostique et l'index de Nottingham

Le grade de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) décrit pour la première fois en 1957, est une classification permettant de déterminer l'agressivité des carcinomes infiltrants (Bloom and Richardson 1957). Dans les années quatre-vingt-dix, il a été modifié notamment pour le rendre plus reproductible par les anglais Ellis et Elston (Elston and Ellis, 1991) en rectifiant le compte des mitoses sur 10 champs consécutifs et en ajustant les seuils pour passer d'un score à l'autre en fonction de la surface du champ microscopique. C'est une méthode simple et peu coûteuse qui permet de déterminer le degré de différenciation d'une tumeur et son activité proliférative. Ce grade histopronostique repose sur l'évaluation semi-quantitative de trois critères histologiques auxquels un score allant de 1 à 3 est attribué (Table 5).

- (1) Tout d'abord, le pourcentage de différenciation (différenciation glandulaire) est apprécié par la proportion de tubules présents au sein de la tumeur (score 1 >70% de tubes ; score 3 <10% de tubes) ;
- (2) Par la suite, le pléomorphisme nucléaire ou anisocaryose est évalué ;
- (3) Pour finir, le nombre de mitoses est compté sur 10 champs à fort grossissement.

Enfin, les scores de ces trois composantes sont additionnés et permettent de distinguer les trois grades histopronostiques. Le score le plus petit étant 3 pour une tumeur bien différenciée avec une formation tubulaire importante et un faible index mitotique ; cette tumeur sera généralement indolente. Le score le plus grand est 9 pour une tumeur agressive peu différenciée qui présente une prolifération importante. On estime que 20% des carcinomes infiltrants sont de grade I, 41% de grade II et enfin 30% de grade III (Figure 10).

Formation de structures glandulaires	
1	Prédominante >75%
2	Modérée 10-75%
3	Faible ou nulle <10%
Anisocaryose	
1	Discrète - Taille semblable aux noyaux normaux
2	Modérée - Taille supérieure aux noyaux normaux
3	Marquée - Noyaux nucléolés et >2,5 la taille des noyaux normaux
Nombre de mitoses	
1	En fonction du nombre de mitoses et de surface du champ microscopique du microscope utilisé
2	
3	
Grade tumoral	Sommes des scores
Grade I	3-4-5
Grade II	6-7
Grade III	8-9

Table 5 | Grade histopronostique Scarff Bloom Richardson modifié par Ellis et Elston

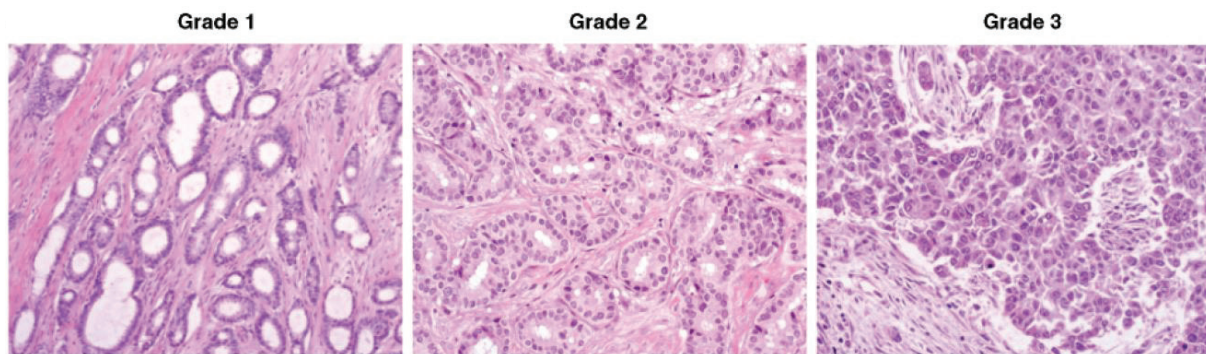


Figure 10 | Les différents grades histopronostiques selon la classification SBR. Adapté de (Rakha et al., 2010)

Les tumeurs de grade III métastasent généralement plus rapidement tandis que pour les tumeurs de grade I, lorsque les métastases se développent, c'est généralement à un stade tardif. Les tumeurs de grade II ont un phénotype intermédiaire. La valeur pronostique de ce grade est aujourd'hui largement admise et utilisée partout dans le monde (Rakha et al., 2008). Les patientes avec une tumeur de grade I ont une survie à 20 ans de plus de 70% tandis que pour le grade II, elle est de 50% et de 40% pour le grade III.

Chaque grade a été associé à un profil transcriptomique spécifique, indépendamment de l'étape de la progression (Ma et al., 2003). Les tumeurs de bas grade sont caractérisées par l'expression des gènes associés aux RO alors que les tumeurs de grade III expriment des gènes associés avec la prolifération cellulaire. Les tumeurs de grade II sont hybrides et présentent un phénotype intermédiaire. Quantitativement, les carcinomes de bas grade histologique présentent moins d'aberrations chromosomiques que les carcinomes de haut grade. Qualitativement, on ne retrouve pas les mêmes aberrations : tandis que les carcinomes de bas grade sont caractérisés par une perte de chromosome 16q et un gain des chromosomes 1q, 16p, et 8q, les carcinomes de haut grade présentent des pertes des 8p, 11q, 13q, 1p, et 18q ; des gains du 8q, 17q, 20q et 16p ; et des amplifications du 17q12 et 11q13 (Buerger et al., 1999; Roylance et al., 1999; Buerger et al., 2001). Les grades intermédiaires présentent un phénotype intermédiaire révélé par une combinaison d'aberrations génomiques retrouvées dans les bas et hauts grades.

Le « Nottingham Prognostic Index » (NPI) prend en compte le grade histopronostique SBR mais aussi les deux autres paramètres morphologiques pronostiques importants que sont le statut des ganglions axillaires et la taille tumorale. Ainsi, le score NPI représente la somme de trois paramètres : le statut ganglionnaire (1, 2, ou 3), le grade histopronostique (1, 2 ou 3) et la taille tumorale en centimètre multipliée par 0,2 (Haybittle et al., 1982; Blamey et al., 2007).

$$\text{Score Nottingham} = \text{Grade} + \text{stade N (1 à 3)} + (\text{Taille en cm} \times 0.2)$$

Il est classiquement utilisé en clinique au vu de sa valeur pronostique. En fonction de leur NPI, on peut distinguer 6 groupes qui présentent différents pronostics allant d'excellent à vraiment mauvais (Figure 11).

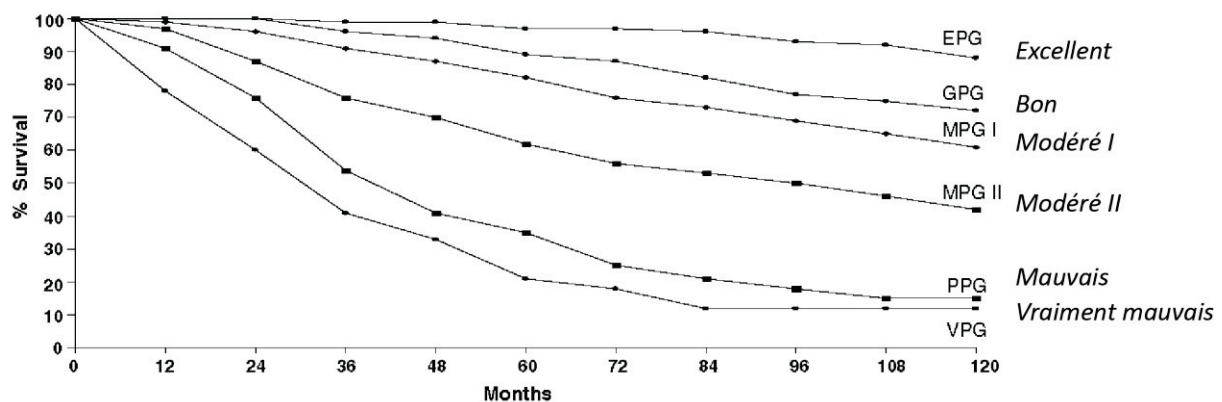


Figure 11 | Survie des patientes atteintes d'un cancer du sein en fonction de leur groupe NPI.

De (Blamey et al., 2007).

III.4. Classification moléculaire des cancers du sein

Avec l'émergence des nouvelles technologies à haut débit pour étudier les modifications génétiques, épigénétiques, transcriptomiques et protéomiques, la compréhension de la complexité des cancers du sein a beaucoup évolué et oriente la médecine vers une personnalisation des traitements administrés aux patients. Dans les années deux mille, Charles Perou et Thérèse Sorlie ont publié une classification moléculaire des carcinomes mammaires infiltrants basée sur l'analyse de 8102 gènes de 42 individus par des puces à ADN (Perou et al., 2000). Ces auteurs ont décrit quatre sous-types moléculaires qu'un certain nombre de gènes permettaient de distinguer, chacun de ces sous-types présentant un profil d'expression particulier : les luminaux, les HER2, les basal et les normal-like. L'année suivante, ils ont démontré la présence d'au moins deux sous-types dans le type luminal, les luminaux A et les luminaux B (Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003). Ces sous-types ont été dénommés « sous-types intrinsèques » car ils présentent une signature intrinsèque basée sur l'expression d'environ 500 gènes (gènes qui présentent une plus grande hétérogénéité intertumorale que intratumorale) (Figure 12 et Table 6).

La transposition en pratique clinique, à l'aide d'analyses immunohistochimiques, permet de classer les carcinomes dans leur classe moléculaire. L'expression des récepteurs aux hormones, le récepteur à la progestérone (RP) et le récepteur à l'œstrogène (RO), ainsi que la surexpression et/ou l'amplification de l'oncogène HER2 associé à un indice de prolifération permettent de les distinguer (Figure 12). L'indice de prolifération est déterminé par l'expression du Ki67, une protéine nucléaire exprimée pendant toutes les phases du cycle cellulaire sauf en G0. Ki67 a une valeur pronostique et

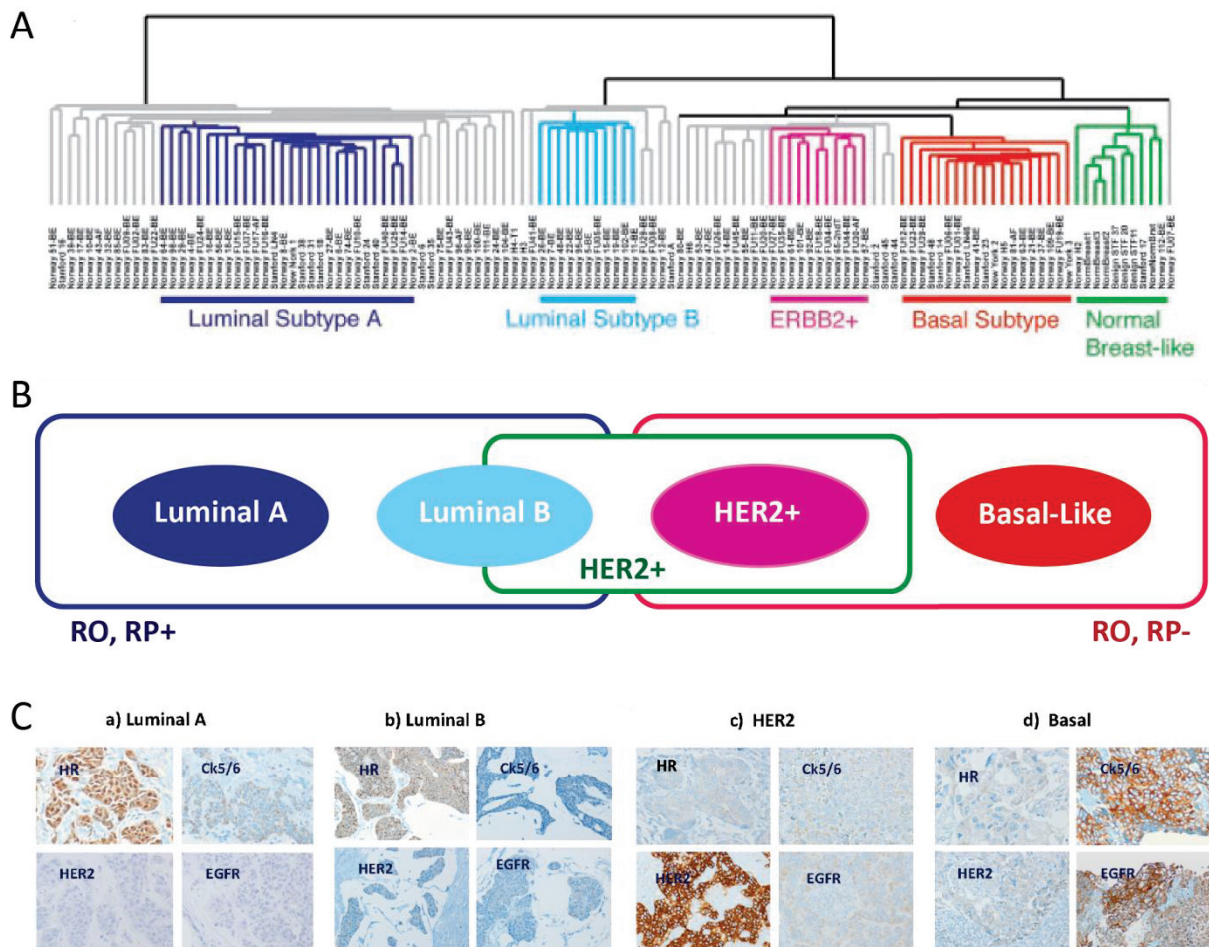


Figure 12 | Les sous-types moléculaires du cancer du sein.

(A) Dendrogramme montrant cinq (six) types moléculaires (Sorlie et al., 2003). (B) Illustration de la classification moléculaire basée sur l'expression des récepteurs aux œstrogènes (RE) et à la progestérone (RP) ainsi que sur la surexpression de l'oncogène HER2. (C) Immunohistochimie sur coupes de tumeurs montrant l'expression des différents marqueurs.

est évalué de manière semi-quantitative : un pourcentage de cellules positives est apprécié (nombre de noyaux positifs en comparaison du nombre de noyaux négatifs) sur toute la tumeur sans prendre en compte l'intensité du marquage.

- (1) Les luminaux A expriment les RO (>10%) et/ou RP (>20%), sont peu prolifératives (Ki67 < 14%) et ne surexpriment pas HER2 ;
- (2) Les luminaux B expriment les RO (>10%) et/ou les RP (<20%) et présentent une plus forte prolifération (Ki67 ≥14%) ;
- (3) Les luminaux B/HER2 surexpriment HER2 et expriment les RH (quel que soit le Ki67) ;
- (4) Le sous-type HER2 contient les tumeurs qui surexpriment HER2 mais n'expriment pas les RH ;
- (5) Enfin, le sous-type basal est caractérisé par une absence de l'expression des RH, une absence de la surexpression de HER2 ainsi que par l'expression de certaines cytokératines basales (CK5/6, 14, 17) et/ou le récepteur à l'EGF (Prat et al., 2013).

Ces sous-types ont une valeur clinique pronostique ; ils présentent des différences notoires dans la survie globale des patientes (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003). Les sous-types basal et HER2 présentent les moins bonnes survies, à l'inverse du type luminal A qui présente la meilleure survie (Figure 13A). Finalement, le sous-type luminal B présente un phénotype intermédiaire, bien qu'ayant une bien moins bonne survie que les luminaux A. Des résultats similaires ont été observés pour la survie sans métastase (Figure 13B).

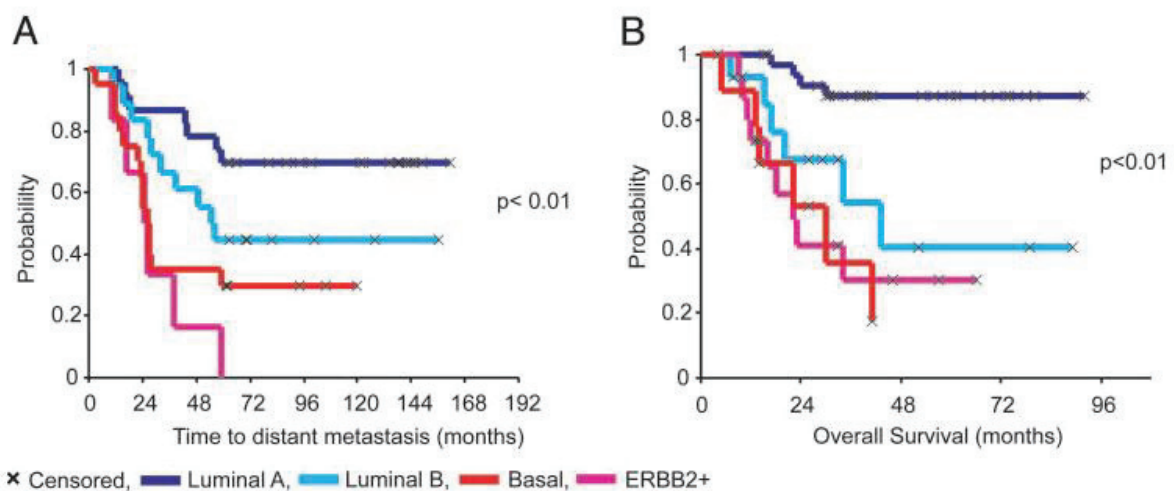


Figure 13 | Survie des patientes atteintes d'un cancer du sein en fonction des sous-types.

(A) Survie sans métastases et (B) survie globale de patientes atteintes d'un cancer du sein en fonction de la classification moléculaire de leur tumeur (Sorlie et al., 2003).

Cette classification et sa valeur pronostique ont par la suite été validées par différentes équipes. Le sous-type normal-like, caractérisé par l'expression de gènes exprimés dans le tissu adipeux et dans les cellules épithéliales, s'avère être probablement un artefact reflétant une contamination des ponctions effectuées par du tissu mammaire normal/adipeux/conjonctif environnant.

III.4.1. Les sous-types luminaux A et B

Les sous-types luminaux représentent le groupe majoritaire : 50 à 60% des cancers du sein sont classifiés luminal A et 10 à 30 % luminal B. Ils ont été dénommés ainsi car leur profil d'expression génétique partageait de fortes similarités avec celui des cellules luminales mammaires saines (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001). Ils sont notamment caractérisés par une forte expression de RH et des voies de signalisation qu'ils contrôlent, et par une absence de surexpression/amplification de HER2 (excepté les luminaux B/HER2). Parmi les gènes dérégulés, on peut citer *GATA3*, *FOXA1*, *XBPI* (X-box binding protein 1) et *MYB*.

Les luminaux A sont histologiquement de bas grade, ont un faible index Ki67 (<14%) et expriment des marqueurs épithéliaux, tels que les cytokératines 8 et 18. Les luminaux A présentent la meilleure survie (90% à 5 ans). Il est à noter que le type luminal A présente un très faible taux de mutation de *TP53* en comparaison des autres types (12%), pouvant notamment expliquer les différences de pronostics. Le taux de mutation *TP53* dans les luminaux B est estimé à 29% (Cancer Genome Atlas, 2012).

On distingue le type luminal B du type luminal A notamment parce que les tumeurs appartenant à ce groupe expriment les RH dans une moindre mesure, tandis qu'elles surexpriment les gènes impliqués dans la prolifération et le cycle cellulaire (Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003; Prat et al., 2013). Les cancers de type luminal B sont donc plus prolifératifs et présentent une forte expression de Ki67 ($\geq 14\%$) et présentent généralement une expression moindre des récepteurs à la progestérone (RP<20%)(Prat et al., 2013). Ils sont de grade histopronostique intermédiaire ou haut. Ils ont une meilleure survie que les sous-types HER2 et basal mais moindre que les luminaux A. D'une manière générale, dans les sous-types luminaux, la survie est corrélée à l'expression de marqueurs de prolifération (Hu et al 2006). A l'intérieur du sous-type luminal B, certains cancers surexpriment et/ou présentent une amplification de l'oncogène HER2, un récepteur contrôlant la prolifération et la survie cellulaire. Ces derniers sont généralement dénommés luminaux B/HER2 pour les distinguer des luminaux B.

Une forte fréquence de mutation *PIK3CA* a été observée dans le groupe luminal mais des données protéomiques montrent une faible activation de la voie PI3K (phosphatidyl-inositol-3-kinase) dans les cancers luminaux A (Cancer Genome Atlas, 2012).

III.4.2. Le sous-type HER2

Représentant environ 20% des cancers du sein, le type HER2 est caractérisé par une surexpression et/ou une amplification de HER2 et des gènes localisés sur l'amplicon HER2 (localisé sur le chromosome 17q22.24) dont GRB7 (growth factor receptor-bound protein 7) et/ou des gènes de la voie de signalisation HER2 (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003). De plus, les tumeurs de ce groupe n'expriment pas ou peu les RH.

Les tumeurs HER2 sont généralement de haut grade histologique. Les patientes atteintes d'un tel cancer présentent un risque de développement de métastases important et une moins bonne survie que des patientes développant un cancer luminal. En effet, l'activation de la voie de signalisation HER2 est associée à une prolifération accrue des cellules accompagnée d'une augmentation de leurs capacités d'invasion et de migration ainsi que leur résistance à l'anoïkis. Le

développement de médicaments ciblant HER2 tels que le trastuzumab - un anticorps monoclonal - en combinaison à de la chimiothérapie, a nettement amélioré la survie de ces patientes (Slamon et al., 2001). Avant le trastuzumab, la survie des patientes atteintes d'un cancer HER2 était bien moindre que pour les luminaux. Ce n'est plus le cas aujourd'hui grâce aux traitements, leur survie se rapproche de celles des luminaux A (données Anne-Vincent Salomon, Institut Curie).

L'intensité du marquage HER2 est établie sur une échelle allant de 0 à 3 (Wolff et al., 2007). La tumeur est classée HER2- lorsqu'il lui est donné un score de 0, 1 ou 2 sans amplification déterminée par FISH (fluorescence *in situ* hybridization). La tumeur est considérée HER2 lorsqu'un score de 2 avec amplification, ou 3 avec ou sans amplification lui est attribué. Certaines disparités existent sur l'évaluation de la surexpression et/ou de l'amplification de HER2 car le marquage HER2 en immunohistochimie peut-être sur ou sous-estimé.

III.4.3. Le sous-type basal

Représentant 10 à 20% des cancers du sein, le sous-type basal n'exprime ni RO, ni RP et ne surexprime pas HER2 (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003). Ce sous-type est caractérisé par une surexpression des gènes similaires aux cellules mammaires basales tels que les cytokératines 5, 6 et 14, l'actine musculaire lisse, l'intégrine $\beta 4$, la laminine, la P-cadherine, le EGFR (epidermal growth factor receptor), KIT. La surexpression de ces gènes est associée à une forte prolifération. Généralement de haut grade, les tumeurs de sous-type basal présentent un fort indice mitotique, et des zones centrales de nécrose.

Ils ont une incidence importante chez les jeunes femmes afro-américaines et chez les patientes porteuses d'une mutation *BRCA1* (Vincent-Salomon et al., 2010). Les tumeurs sont de haut grade et très prolifératives. Les patientes présentent la moins bonne survie en comparaison des autres sous-types. Elles ont plus de risques de développer des métastases dans les 5 ans après le diagnostic bien que cette différence ne soit plus valable après 5 ans (Dent et al., 2009). Les métastases qui se développent chez ces patientes sont plus souvent viscérales en comparaison des autres types moléculaires du sein et surtout pulmonaires. Il n'existe à l'heure actuelle pas de thérapie ciblée pour ce type de cancer, les patientes reçoivent une chimiothérapie après ou avant la chirurgie.

La perte de *PTEN* et l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT ainsi que les mutations *TP53* sont fréquentes dans ce sous-type (Manie et al., 2009; Cancer Genome Atlas, 2012). Une grande majorité des tumeurs de sous-type basal présentent une mutation *TP53* et c'est dans ce sous-type que l'on trouve la plus forte activation de la voie PI3K/AKT. Ces tumeurs présentent une forte instabilité génomique avec de nombreuses altérations à faible copie et peu d'amplification et de

délétion. De nombreuses pertes d'hétérozygoties sont aussi observées dans certains chromosomes tels que le 4q, 5q and 8p et des gains sur les chromosomes 1q, 3q, 8q and 12p.

Bien que les sous-types basal et triple négatif (RO-, RP-, HER2-) ne soient pas strictement équivalents, certains cancers de type basal ne sont pas triple-négatif et certains cancers de type triple-négatif ne sont pas basal (Rakha et al., 2007). La distinction entre basal et triple négatif est basée principalement sur l'expression de cytokératines basales tels que les kératines 5/6 ainsi que sur le récepteur à l'EGF (Cheang et al., 2008).

	LUM A	LUM B/HER2-	LUM B/HER2	HER2	BASAL
PREVALENCE	50-60%	15-20%	6%	20%	10-20%
RO	>10%	>10%		<10%	<10%
RP	>20%	<20%		<10%	<10%
HER2	négatif	négatif	positif	positif	négatif
Ki67	faible (<14%)	fort (≥14%)	quelqu'il soit	fort	fort
DIFFERENCIATION	forte	modérée		faible	faible
GRADE SBR	bas	intermédiaire/haut		haut	haut
PRONOSTIC	bon	intermédiaire		mauvais	mauvais
GENES	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, FOXA1, XBP1,	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, MYC, TFF3		HER2, GRB7, EGFR	KRT5, KRT17, BRCA1
MUTATION TP53	12%	32%		75%	84-100%
MUTATION PI3KCA	49%	32%		42%	7%
MUTATION PTEN	13%	24%		19%	35%

Table 6 | Caractéristiques histopathologies, biologiques et cliniques des sous-types moléculaires des cancers du sein. Adapté de (Cancer Genome Atlas, 2012; Lam et al., 2014).

III.4.4. Les autres sous-types

Par la suite, plusieurs autres sous-types n'exprimant pas les RH ont été décrits dans la littérature, mais leur pertinence biologique et clinique reste à clarifier. Parmi eux, on trouve :

- (1) Le sous-type « claudin-low » est proche du sous-type basal avec une faible expression de HER2 et des gènes de types luminaux, associés à un mauvais pronostic et une forte infiltration lymphocytaire. Cependant, ce sous-type ne présente pas une forte activité proliférative et une faible expression de protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire (claudines 3, 4, 7, cinguline, occludine et E-cadhérine) et une surexpression de gènes mésenchymateux et associés aux cellules souches (Herschkowitz et al., 2007; Prat et al., 2010).
- (2) Le sous-type « molecular apocrine » est proche du sous-type HER2 et regroupe de nombreuses tumeurs présentant une surexpression/amplification du récepteur HER2. Cependant, les cancers de ce sous-type expriment le récepteur aux androgènes et sont associés à une forte activation de la voie de signalisation des androgènes (Farmer et al., 2005).

III.5. Concordances entre les classifications histologique et moléculaire

Dans leur étude, Pérou et al. avaient analysé majoritairement des carcinomes canalaux infiltrants de type non spécifique et seulement deux carcinomes infiltrants lobulaires (Perou et al., 2000). Cette analyse subjective ne représente donc pas l'hétérogénéité importante des cancers du sein, notamment la diversité des sous-types histologiques décrits. Une question fut alors soulevée : est-ce que les sous-types histologiques pourraient correspondre à des sous-types moléculaires spécifiques ? Weigelt a notamment analysé le génome de 11 types histologiques spécifiques et étonnamment, il a montré que les tumeurs de sous-types spécifiques semblent beaucoup plus homogènes que les carcinomes invasifs infiltrants de types non spécifiques, et les carcinomes infiltrants lobulaires (à l'exception du sous-type apocrine) (Weigelt et al., 2008; Gruel et al., 2010). Chaque sous-type histologique a été alors préférentiellement associé à un sous-groupe moléculaire. Par exemple, les sous-types tubuleux, mucineux présentent un phénotype luminal tandis que les sous-types médullaires ou métaplasiques sont en majorité de type basal en accord avec de précédentes études, bien que les sous-types histologiques de même sous-type moléculaire présentaient aussi de nombreuses différences génomiques et transcriptomiques (Vincent-Salomon et al., 2008; Weigelt et al., 2009).

III.6. Classifications moléculaires, modèles en développement

Plus récemment, l'équipe de Carlos Caldas en se basant sur l'étude des altérations génomiques (SNP, single nucleotide polymorphism ; CNV, copy number variant ; SNV, single nucleotide variant ; CNA, copy number aberration) sur 2000 échantillons de tumeurs a mis en évidence l'existence de 10 sous-types génomiques dans les cancers du sein (Curtis et al., 2012). La classification moléculaire n'est donc pas définitive mais est un « modèle en développement ». Elle devrait être affinée en prenant notamment en considération les altérations génomiques, transcriptomiques et protéiques des tumeurs, l'hétérogénéité intratumorale ainsi que les potentiels nouveaux sous-types afin d'être plus reproductible et stable et aider à la découverte de nouvelles thérapies ciblées.

L'hétérogénéité ainsi que la complexité des cancers du sein, tant au niveau épidémiologique et étiologique qu'au niveau histologique et moléculaire, sont aujourd'hui communément admises. Les nombreuses classifications existantes essaient de rendre compte de cette hétérogénéité tumorale, et continuent d'être affinées au fur et à mesure des observations faites. Dans le futur, l'utilisation d'une combinaison d'analyses (caractéristiques cliniques des patients, histologie des tumeurs (leur grade/leur type), classification moléculaire) devrait permettre d'affiner les diagnostics et traitements des femmes atteintes d'un cancer du sein.

V. Traitements

Développer des thérapies adaptées à chaque forme de cancer du sein représente un véritable défi. Les traitements des cancers du sein relèvent d'une prise en charge multidisciplinaire. Les traitements locaux, tels que la chirurgie et la radiothérapie, sont des traitements incontournables. Puis les traitements généraux, comme la chimiothérapie et l'hormonothérapie, se font par voie générale et sont prescrits en fonction des caractéristiques des cancers. Nous nous dirigeons vers une médecine personnalisée où chaque traitement devrait être adapté en fonction des caractéristiques cliniques des patientes mais aussi des critères intrinsèques des tumeurs. Une brève description est faite des traitements majeurs couramment utilisés en clinique pour traiter les cancers du sein.

V.1. Chirurgies

C'est la base du traitement du cancer du sein. Chez deux tiers des patientes, la chirurgie est conservatrice c'est-à-dire qu'elle a pour but d'enlever la totalité de la tumeur sans enlever l'intégralité du sein (avec une marge de sécurité suffisante pour éviter la récurrence) (Association of Breast Surgery at, 2009). Pour le tiers restant, lorsque la taille ou la multifocalité de la tumeur l'exigent, la mastectomie consiste à enlever l'ensemble de la glande mammaire, aréole et mamelon

inclus. Le ganglion le plus proche de la tumeur est appelé ganglion sentinelle, c'est le premier à être potentiellement envahi par les cellules cancéreuses. Si la tumeur n'est pas trop volumineuse et qu'il n'y a pas d'adénopathies palpables au creux axillaire, le chirurgien peut prélever sélectivement le ganglion sentinelle. Une analyse extemporanée de ce dernier permettra d'éviter un curage ganglionnaire complet si aucun envahissement métastatique n'est observé. Par la suite, des traitements adjuvants, c'est-à-dire qui complètent la chirurgie, sont réalisés et varient en fonction des patientes et des singularités de leur cancer.

V.2. Radiothérapies

Après une chirurgie, la majorité des patientes reçoivent une radiothérapie du sein (radiothérapie postopératoire) (Clarke et al., 2005). Ce traitement locorégional a pour objectif d'éradiquer les cellules tumorales résiduelles qui auraient pu échapper à la chirurgie en dehors du lit tumoral principal en les irradiant avec des rayons X ou gammas tout en préservant le tissu sain environnant la tumeur. Les particules ionisantes vont provoquer des dommages de l'ADN et entraîner l'apoptose des cellules tumorales. On estime que plus de la moitié des femmes diagnostiquées avec un cancer du sein suivront une radiothérapie au cours de leur traitement. Elle diminue considérablement la récurrence et améliore la survie à long-terme des patientes traitées.

V.3. Chimiothérapies

La chimiothérapie peut-être néoadjuvante dans certaines situations (c'est-à-dire avant la chirurgie) mais elle est adjuvante dans la plupart des cas (pour article de revue, voir (Yeo et al., 2014)). Pour déterminer quel type de chimiothérapie recommander à une patiente, les facteurs de risque de récurrence tels que le nombre de ganglions envahis, le grade de la tumeur, la taille de la tumeur, l'expression des RH, l'expression de HER2, l'âge de la patiente sont pris en compte. Il existe de nombreux agents chimiothérapeutiques et les polychimiothérapies sont plus efficaces que les monochimiothérapies. Les médicaments les plus fréquemment utilisés sont le doxorubicine et l'épirubicine, qui sont avec les taxanes, les médicaments de référence. Différents protocoles de chimiothérapies existent et se déroulent en plusieurs cures où la patiente reçoit le traitement par voie sanguine.

V.4. Thérapies ciblées

Des traitements hormonothérapeutiques, anti-HER2, ou plus rarement antiangiogéniques, ont été développés dans le but de pallier l'hétérogénéité des carcinomes mammaires et de leurs réponses aux divers traitements. Certains types de cancer restent dépourvus de traitements ciblés. Actuellement, de plus en plus de thérapies ciblées sont développées et en phase d'essai clinique. Les deux grandes thérapies ciblées qui ont démontré leurs bénéfices thérapeutiques sont l'hormonothérapie, qui cible les tumeurs exprimant les RH, et les thérapies anti-HER2, destinées aux patientes dont les tumeurs surexpriment HER2. En phase métastatique, les thérapies anti-angiogéniques commencent à être utilisées.

V.4.1. Hormonothérapies

L'hormonothérapie est administrée aux femmes présentant un carcinome hormono-sensible c'est-à-dire qui expriment les RO et/ou les RP ($\geq 10\%$; seuil européen pour considérer la tumeur potentiellement hormonosensible) (Hammond et al., 2010). Afin de limiter l'action proliférative des RH, l'hormonothérapie va tout simplement permettre de bloquer leur action ou d'inhiber leur production. Elle peut être néoadjuvante dans le but de réduire la taille de la tumeur avant une chirurgie ou une radiothérapie, mais est le plus souvent administrée après l'exérèse de la tumeur. Trois types d'hormonothérapies sont aujourd'hui utilisés en traitement adjuvant : le tamoxifène, les anti-aromatases, et la suppression ovarienne chez les femmes non ménopausées. Utilisés principalement chez les femmes pré-ménopausées, le tamoxifène est un anti-œstrogénique au vu de sa capacité à se lier aux RH par un de ses métabolites actifs et ainsi à inhiber leur action. Les inhibiteurs d'aromatases ou anti-aromatases inhibent la fabrication des œstrogènes chez les femmes ménopausées. Ils entrent en compétition avec l'aromatase, enzyme qui catalyse certaines hormones stéroïdiennes, dont les androgènes, en œstrogènes qui agissent ensuite sur leur récepteur. Différentes techniques sont employées pour bloquer la production des œstrogènes par les ovaires : des oophorectomies bilatérales, le fonctionnement des ovaires peut être arrêté par l'utilisation des inhibiteurs d'hormones stimulant la production ovarienne d'œstrogènes.

V.4.2. Thérapies anti-HER2

Plusieurs stratégies thérapeutiques agissent sur la voie de signalisation HER2 (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab) afin de l'inhiber et de réduire la prolifération tumorale des carcinomes le surexprimant (Slamon et al., 2001; Geyer et al., 2006; Baselga et al., 2012). Le trastuzumab, commercialisé sous le nom d'Herceptin, est un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre la

partie extra-extracellulaire de HER2. Son développement récent a bouleversé la survie des patientes porteuses d'un cancer surexprimant HER2. Avant le développement du trastuzumab, ces mêmes patientes avaient une des plus courtes survies globales avec celles développant un cancer de sous-type basal. Aujourd'hui, elles ont une survie globale presque similaire à celle des femmes développant un cancer luminal A, et bien meilleure que dans le cas des cancers luminaux B. Cependant, des mécanismes de résistance primaire ou secondaire au trastuzumab, généralement lors d'une rechute, peuvent s'observer. D'autres médicaments tels que le lapatinib ont été développés pour inhiber l'activité tyrosine kinase de HER2 pour tenter de contourner cette résistance.

En conclusion, le cancer du sein n'est plus perçu comme une pathologie unique mais un éventail de cancers hétérogènes que de multiples classifications tentent de différencier. Afin de s'adapter à cette importante hétérogénéité tumorale, divers traitements de plus en plus personnalisés sont développés et tentent de limiter la progression tumorale et métastatique des carcinomes mammaires.

Chapitre 3. La cascade tumorale mammaire : des origines à la colonisation

La progression tumorale est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes et peut s'étendre sur de très longues périodes de temps. Depuis les origines des cancers du sein jusqu'à une potentielle colonisation métastatique, nous aborderons les nombreuses étapes orchestrées par de multiples voies de signalisation cellulaires ainsi que par la présence des divers environnements auxquels les cellules tumorales vont être confrontées. De nombreux modèles murins et cellulaires tentent de récapituler la complexité de ces événements afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

I. Cellule d'origine et cellules souches cancéreuses

Deux modèles concernant l'origine des cancers du sein tentent d'expliquer l'hétérogénéité des carcinomes mammaires. Développé dans les années soixante-dix, le modèle d'évolution clonale non hiérarchique propose qu'une cellule unique soit à l'origine des cancers. Elle acquiert des altérations génétiques et épigénétiques spontanées qui lui confèrent un avantage sélectif et des propriétés tumorales (Nowell, 1976). Au fur et à mesure de la progression tumorale, l'instabilité génétique favorise le développement de divers clones qui présentent différentes capacités de prolifération, d'invasion, etc. et sont soumis à une sélection Darwinienne. Ainsi, différentes altérations génétiques et épigénétiques dans la même cellule cible entraînent la formation de tumeurs hétérogènes.

Le modèle des cellules souches cancéreuses suggère que les cellules souches et les progéniteurs mammaires seraient à l'origine des cancers du sein. Les cellules souches normales résident durant de longues périodes au sein de l'épithélium mammaire adulte et pourraient acquérir, au fur et à mesure, des altérations génétiques et épigénétiques entraînant la formation d'une cellule souche cancéreuse (pour article de revue, (Visvader and Lindeman, 2011)). Un même événement oncogénique survenant dans diverses cellules du lignage mammaire donne naissance à différents sous-types de cancer. C'est l'état de différenciation de la cellule d'origine qui serait à l'origine de l'hétérogénéité morphologique et moléculaire des cancers du sein. Les différents types de cellules souches/progéniteurs donneraient naissance aux différents sous-types moléculaires et histologiques. Certaines études soutiennent cette dernière hypothèse. Par exemple, le profil d'expression génique des progéniteurs luminaux est similaire au sous-type basal et une augmentation des progéniteurs luminaux est observée dans les lésions pré-néoplasiques des femmes présentant une mutation dans le gène *BRCA1* (Lim et al., 2009b). En utilisant un « modèle de prédiction de la différenciation » (Prat and Perou, 2011), les carcinomes ont été classifiés selon une hiérarchie de la différenciation épithéliale allant d'un phénotype mésenchymal, à un phénotype basal (présentant des caractéristiques mésenchymales basales et luminales) et finalement au phénotype luminal.

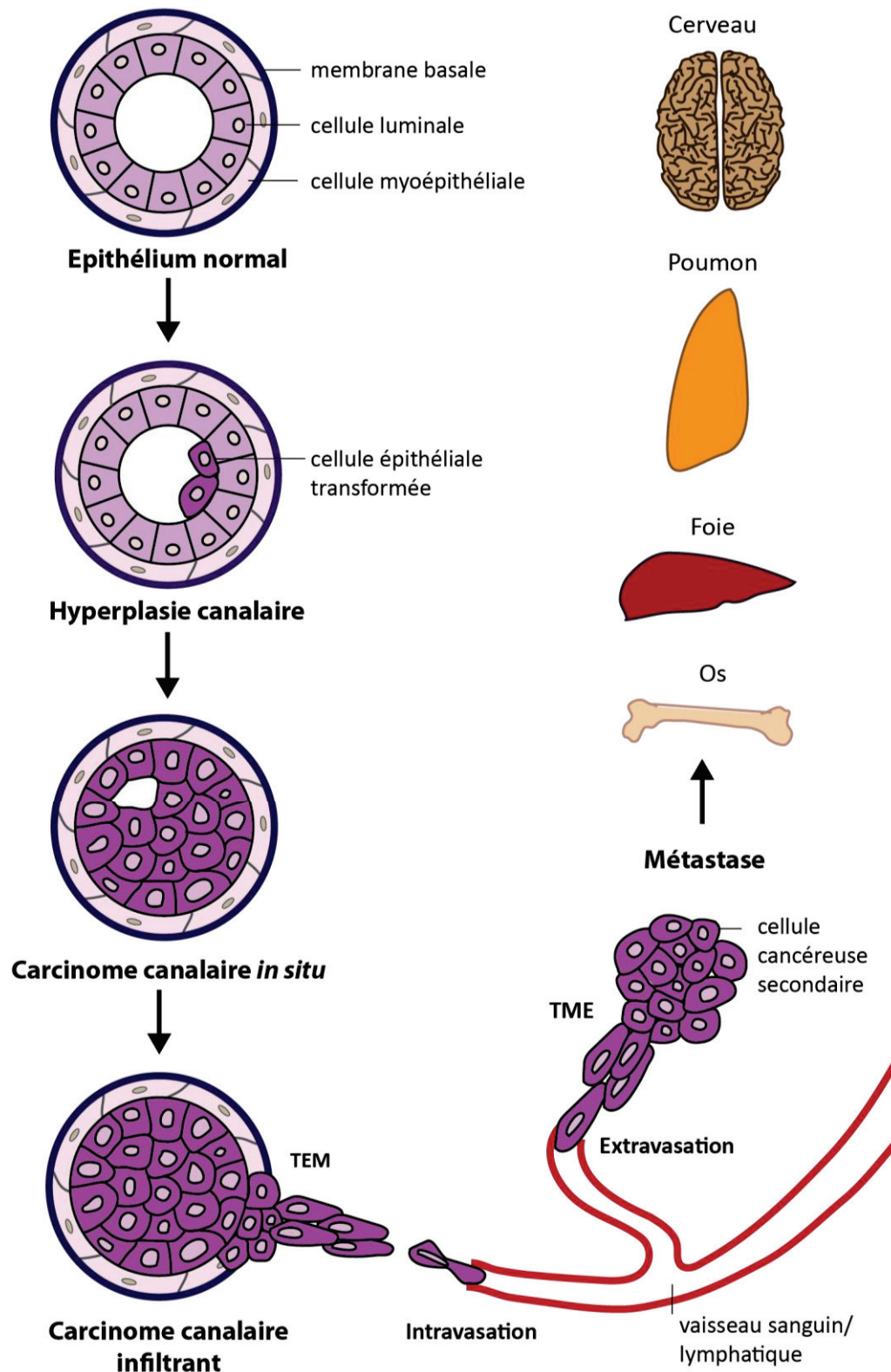


Figure 14 | Les différentes étapes de la carcinogenèse mammaire.

Une hyperplasie simple ou atypique se développe généralement au sein d'un canal mammaire. Elle peut évoluer en carcinome *in situ*, caractérisé par sa restriction physique à la glande, qui représente 20% de l'ensemble des cancers du sein. Dans la majorité des cas, il y a rupture de la membrane basale, le carcinome est alors infiltrant et les cellules tumorales peuvent envahir des organes secondaires en circulant dans les systèmes sanguins et lymphatiques.

Le sous-type « claudin-low » dériverait des MaSCs, le sous-type basal des progéniteurs luminaux et les sous-types luminaux des cellules lumentales matures. Il est aussi envisagé que les MaSCs soient les seules à l'origine des cancers ; cependant elles donneraient naissance, au fur et à mesure de leur division asymétrique, à des différents progéniteurs en fonction du contexte tumoral et ainsi, la majorité de la masse tumorale serait composée de cellules différenciées. Enfin, il n'est pas exclu que les cellules souches cancéreuses ne dérivent pas des cellules souches normales mais des progéniteurs et des cellules plus différenciées ayant acquis des capacités d'auto-renouvellement au cours de l'acquisition d'altérations génétiques. La présence de cellules souches cancéreuses au sein de la tumeur pourrait expliquer la résistance à certaines radiations et chimiothérapies.

Ces deux modèles ne sont pas exclusifs mais plutôt complémentaires, les cellules souches pouvant subir une évolution clonale. Les origines des cancers ne sont donc encore que très partiellement comprises et des futures études devraient permettre d'élucider les cellules d'origine des cancers du sein.

II. Évolution moléculaire de la progression tumorale

Historiquement, la progression tumorale est vue comme un processus multi-étapes dont la progression linéaire est schématisée dans la Figure 14. La plupart des néoplasies mammaires prennent naissance dans les UTDs (unités terminales ductolobulaires). Les hyperplasies atypiques sont présentées comme les premières étapes du développement tumoral des tumeurs de bas grade et sont définies par une prolifération cellulaire anormale pouvant envahir la lumière des canaux galactophoriques. Les précurseurs des lésions de haut grade sont inconnus. La plupart de ces lésions n'évolueront pas en carcinomes cependant certaines accumulent des altérations génétiques qui transforment ces cellules bénignes en cellules malignes tumorales. La tumeur développée est dénommée *in situ* car elle est restreinte au tissu mammaire, enrobée par la membrane basale. A ce stade de progression, la maladie est locale et la survie des individus n'est pas impliquée. Certaines cellules tumorales peuvent, suite à l'acquisition de capacités d'invasion, dégrader la membrane basale pour envahir le tissu péri-tumoral. Le cancer est alors qualifié d'infiltrant ou invasif et la colonisation métastatique peut avoir lieu. Les cellules vont envahir le tissu environnant pour atteindre la circulation lymphatique et sanguine, et y circuler jusqu'à un organe hôte dans lequel elles pourront potentiellement reformer une tumeur secondaire, une métastase. Le cancer est alors métastatique et la survie des femmes atteintes est engagée. Les cellules tumorales mammaires peuvent métastaser dans divers organes : principalement les os, le foie mais aussi, à certains stades avancés, dans le cerveau des patientes.

Aujourd'hui, la progression tumorale n'est plus vue comme une voie linéaire exclusive mais comme une série d'événements complexes menant à différentes voies vers un cancer invasif. En comparaison de l'épithélium normal, de nombreuses altérations moléculaires ont lieu dans les ADH (atypical ductal hyperplasia) et sont retrouvées dans les DCIS et IDC. En s'intéressant aux différentes étapes de la progression tumorale, et notamment aux différences entre des DCIS et des DCIS avec une composante infiltrante ou encore entre carcinome infiltrant et métastatique, il apparaît que le transcriptome des tumeurs est relativement stable au cours de la progression cancéreuse (Ma et al., 2003; Porter and Polyak, 2003; Weigelt et al., 2003; Hwang et al., 2004; Weigelt et al., 2005; Hannemann et al., 2006; Vincent-Salomon et al., 2008). Les cancers *in situ* et infiltrant d'un même type histologique partagent majoritairement les mêmes profils d'expression génique avec de nombreuses altérations génétiques et épigénétiques communes. Toutefois, les IDC ont tendance à présenter plus de changements chromosomiques que les DCIS purs (Hwang et al., 2004; Yao et al., 2006; Vincent-Salomon et al., 2008). En analysant les lésions histologiques allant de l'hyperplasie canalaire atypique, au DCIS et à l'IDC jusqu'à IDC avec présence de métastases, il est possible de les classer selon un sous-type moléculaire décrit par Charles Perou et Thérèse Sorlie (Perou et al., 2000 ; Sorlie et al., 2001).

Bien qu'aucun profil d'expression génique spécifique à chaque stade histologique de la progression tumorale ne soit identifié, les ADH, les DCIS et IDC de bas grades sont caractérisés par l'expression de gènes associés avec les RO alors que les DCIS et IDC de haut grade expriment des gènes associés avec la prolifération cellulaire. La transition entre DCIS et IDC pourrait donc être liée à des modifications quantitatives plutôt que qualitatives. Il semble peu courant, au vu des différences qualitatives des aberrations génétiques observées dans les hauts et bas grades, que les carcinomes de bas grade évoluent vers des carcinomes de haut grade (Buerger et al., 2001). Ces résultats suggèrent qu'une évolution clonale serait responsable de la progression tumorale et que deux grandes voies d'évolution, biologiquement et cliniquement différentes, seraient associées aux grades histologiques des carcinomes : une voie « bas grade » et une voie « haut grade ».

- (1) Dans la voie « bas grade », contenant les carcinomes de grade bas ou intermédiaire, les cellules tumorales expriment généralement RO et RP, ont un faible grade nucléaire, ne sont pas enrichies en HER2 et les marqueurs basaux avec une faible instabilité génétique. Les carcinomes luminaux de bas grade pourraient évoluer en carcinomes de haut grade comme suggéré par l'augmentation de la fréquence de la perte du 16q dans les carcinomes de haut grade. Les LCIS et les ILC sont très similaires aux carcinomes de bas grade.
- (2) Dans la voie « haut grade », contenant les carcinomes de haut grade, les cellules tumorales sont fréquemment négatives pour l'expression des RO et des RP et positives pour la surexpression/amplification de HER2 ou des marqueurs basaux avec de nombreuses et complexes aberrations génétiques et un haut pléomorphisme nucléaire.

Ainsi, de nombreuses études suggèrent que d'une part, la ADH et les DCIS et IDC et d'autre part, la ALH (atypical lobular hyperplasia), les LCIS et ILC de bas grade représentent des continuums. Les précurseurs des LCIS et DCIS de haut grade n'ont pas encore été clairement identifiés.

III. Les différentes étapes de la cascade métastatique

Les métastases (du grec, « déplacement » et du latin, « au-delà du calme ») représentent la première cause de mortalité par cancer (plus de 90%) et limiter leur évolution est un réel défi thérapeutique. Plus de 30% des femmes présentant un cancer du sein développeront des métastases des mois, voire des années, après leur diagnostic. Au cours de ce processus multi-étapes complexe, les cellules tumorales vont s'adapter à un microenvironnement étranger pour former une tumeur secondaire dans un tissu hôte : c'est la colonisation métastatique. Les cellules doivent tout d'abord migrer et envahir le tissu environnant avant d'atteindre la circulation lymphatique et sanguine (par des vaisseaux néoformés au sein de la tumeur) pour y être transportées jusqu'à des organes viscéraux où elles peuvent former une tumeur.

III.1 La transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse ou TEM fut initialement décrite comme un processus développemental essentiel à la formation de nombreux tissus dont le tube neural. Le concept de la TEM est assez récent dans le domaine de l'oncologie (pour articles de revue, (Thiery et al., 2009; Wang and Zhou, 2011; Foroni et al., 2012)). Lors d'une TEM, en réponse à un signal cellulaire, de nombreuses modifications transcriptionnelles et protéiques entraînent des changements cellulaires et moléculaires importants. Les cellules épithéliales, caractérisées par une polarité apico-basale et l'expression des marqueurs de jonctions intercellulaires, perdent progressivement leur phénotype pour acquérir un phénotype mésenchymal. Ce dernier est caractérisé par une morphologie cellulaire allongée, associée à une perte de la polarité et de l'adhésion cellule-cellule ainsi qu'à une augmentation des capacités de migration, d'invasion et de résistance à l'anoïkis. La TEM est donc caractérisée par :

- (1) la perte/relocalisation : des marqueurs des jonctions intercellulaires et de la polarité apico-basale incluant la E-cadhérine (des jonctions adhérentes) ; des occludines, des claudines et de ZO1 (des jonctions serrées) ; et de la desmoplakine (des desmosomes) ;
- (2) la diminution d'expression des cytokératines épithéliales, une augmentation de l'expression de la vimentine, de la N-cadhérine et de l'actine musculaire lisse ;
- (3) la réorganisation du cytosquelette nécessaire au changement morphologique ;

- (4) la production de métalloprotéinases matricielles (MMP, matrix metalloproteinase) permettant le remodelage de la MEC ;
- (5) l'augmentation de la motilité et de l'invasion cellulaire impliquant les microfilaments d'actine ;
- (6) l'augmentation de la résistance à l'anoïkis.

Parmi les principaux régulateurs de la TEM, de nombreux facteurs de transcriptions et de croissance, fonctionnant comme des « interrupteurs » de la TEM, ont été impliqués. *Snail*, *Slug*, *Twist*, *ZEB1* (zinc finger E-box binding homeobox 1), *ZEB2* (zinc finger E-box binding homeobox 2) régulent notamment l'expression de protéines d'adhésion dont la E-cadhérine, les claudines, les occludines (pour articles de revue, (Thiery and Sleeman, 2006; Thiery et al., 2009; Wang and Zhou, 2011; Foroni et al., 2012)). Ils peuvent notamment interagir avec la E-box présente sur le promoteur de la E-cadhérine et inhiber ainsi sa transcription. Des facteurs de croissance ou encore des composants de la MEC peuvent entraîner une TEM dans des cellules épithéliales. Parmi eux, on peut citer le TGF- β (transforming growth factor β), les facteurs de croissance des fibroblastes, les EGFs, les IGF-1 et IGF-2 (insulin-like growth factor). Les voies de signalisation WNT, Hedgehog, NOTCH et intégrines coordonnent la TEM.

Des mécanismes semblables à la TEM se mettent en place durant la progression tumorale des carcinomes, notamment au cours de l'invasion. Au niveau histologique, le front de migration des carcinomes présente une architecture moins cohésive et différenciée en comparaison de la région centrale de la tumeur. Certains phénotypes de la TEM tels que la perte d'expression des cytokératines épithéliales, l'expression ectopique de vimentine, sont associés à un haut grade histologique, un haut indice mitotique et une absence d'expression des RH (Willipinski-Stapelfeldt et al., 2005). En se basant sur une étude immunohistochimique sur des microarrays de tissu ou « tissu microarray » (TMA) de 479 carcinomes infiltrants, Sarrio et al., ont observé une signature TEM dans le sous-type basal (Sarrio et al., 2008). En analysant les profils d'expression génique par puces à ARN à partir d'échantillons d'individus avec un cancer du sein, l'activation des voies de la TEM semble corrélée au grade histopronostique (Teschendorff et al., 2007). Les composants des voies de signalisation impliquées dans la TEM seraient surexprimés dans les cancers de haut grade et cette surexpression serait associée à un mauvais pronostic. L'expression de *Twist* chez les individus est positivement corrélée avec les tumeurs de haut grade (Mironchik et al., 2005) et l'expression de *SNAI1* est négativement corrélée au degré de différenciation des carcinomes (Blanco et al., 2002).

III.2. L'invasion du tissu peritumoral

La migration est un mécanisme cellulaire très dynamique au cours duquel les cellules se déplacent sur un substrat ou au sein d'une matrice pour migrer. Les cellules peuvent migrer individuellement ou de façon collective. Différents types de migration et d'invasion ont été décrits : la migration individuelle et la migration collective, chacune caractérisée par différentes voies de signalisation. Durant la migration collective de cellules tumorales, une certaine cohésion est maintenue entre les cellules qui se déplacent en amas. En permettant aux cellules tumorales d'envahir leur microenvironnement, la dégradation de la matrice extracellulaire est essentielle à la dissémination métastatique. Elle est assurée par les MMPs, produites par les cellules tumorales mais aussi par des cellules du stroma (majoritairement les fibroblastes).

III.3. L'intravasation dans la circulation

L'intravasation fait référence à l'invasion d'une cellule tumorale à travers la membrane basale des vaisseaux lymphatiques ou sanguins. L'angiogenèse tumorale est donc un prérequis, non seulement à la croissance tumorale, mais aussi à la colonisation métastatique. Les cellules tumorales peuvent pénétrer dans la circulation de manière passive ou active : la perméabilité des vaisseaux sanguins permet un passage passif des cellules, tandis que les chémokines sont impliquées dans le transport actif des cellules tumorales (Bockhorn et al., 2007). Les cellules adhèrent aux cellules endothéliales, puis à la MEC sous-jacente, et pénètrent ainsi dans la circulation lymphatique ou sanguine. Les macrophages associés à la tumeur sont capables de guider les cellules tumorales aux sites d'intravasation.

III.4. La survie dans la circulation : résistance à l'anoïkis

En 1994, Frisch et Francis furent les premiers à proposer le terme anoïkis (du grec, an-o-TT-kos ; état d'être sans maison), pour décrire la réponse cellulaire apoptotique induite en absence d'interactions, ou en présence d'interactions inappropriées entre les cellules et leur matrice environnante (Frisch and Francis, 1994). Ces auteurs ont observé que suite à leur transformation avec des oncogènes, des cellules épithéliales normales deviennent résistantes à l'anoïkis. L'anoïkis pourrait alors ralentir la progression tumorale des cellules cancéreuses une fois qu'elles sont localisées dans un tissu autre que le tissu mammaire. Ce type de mort cellulaire intervient donc à de multiples étapes de la cascade métastatique : de l'invasion, l'intravasation et transport dans les vaisseaux, jusqu'à l'extravasation et la survie dans des organes secondaires. Dans la circulation, les cellules tumorales circulantes ne prolifèrent pas et la plupart d'entre elles sont destinées à mourir :

les lymphocytes T cytotoxiques (Natural Killer) du système immunitaire et les lymphocytes T ciblent les cellules cancéreuses pour les lyser.

III.5. L'extravasation de la circulation

L'extravasation correspond à la sortie des cellules tumorales des capillaires lymphatiques et sanguins pour envahir les organes environnants (Miles et al., 2008). Les mécanismes permettant l'extravasation des cellules sont similaires à ceux mis en jeu au cours de l'intravasation et de l'invasion. Les réseaux capillaires expriment certains marqueurs spécifiques dans chaque tissu de l'organisme qui permettent aux cellules circulantes de discerner leur tissu cible et de s'y arrêter. Par exemple, le foie, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse et les poumons expriment CXCL12 (C-X-C motif chemokine 12), une chémokine ligand de son récepteur, CXCR4 (C-X-C motif receptor 4) qui lui-même est exprimé par les cellules tumorales (Muller et al., 2001). D'autres interactions cellulaires participent aux contacts entre cellules endothéliales et cellules tumorales ; CD44 (cluster of differentiation 44) se lie à certains constituants de la MEC (collagène IV, fibronectine). S'ensuit une rétraction des cellules endothéliales permettant aux cellules tumorales de dégrader la membrane basale et la MEC sous-jacente avant de pénétrer dans le parenchyme adjacent.

III.6. La colonisation métastatique des organes secondaires

Une fois localisée au niveau de son organe cible, les cellules tumorales peuvent rester dans un état de dormance pendant de longues périodes (Luzzi et al., 1998), avant de développer une tumeur secondaire. Le processus inverse à la TEM, la transition mésenchymato-épithéliale (TME), également décrit au cours de l'embryogenèse, semble exister au cours de cette étape. Les cellules sont alors capables de réacquérir un phénotype épithélial et d'être à l'origine d'une nouvelle tumeur. Contrairement à la TEM, la TME n'est que très peu décrite.

Afin de comprendre l'évolution métastatique, deux modèles de progression co-existent : linéaire et parallèle. Dans le modèle de progression linéaire, les cellules des tumeurs primaires donnent naissance, après de multiples mutations, à des populations hétérogènes n'ayant pas les mêmes capacités métastatiques (Fidler and Lieber, 1972). Dans le modèle de progression parallèle, la dissémination des cellules tumorales serait un évènement très précoce, et leur évolution, indépendante des cellules de la tumeur primaire, leur permettrait de coloniser les organes secondaires.

La localisation des métastases n'est pas anarchique au sein de l'organisme, elle est spécifique à chaque cancer, et l'anatomie de la circulation sanguine et lymphatique ne permet pas d'expliquer cette spécificité. En 1889, Stephen Paget avait proposé la théorie de « la graine et du sol », selon laquelle une graine (la cellule tumorale) ne peut se développer que dans un sol propice (le microenvironnement de l'organe hôte). La nature de l'organe cible ne dépend donc pas seulement des propriétés intrinsèques des cellules tumorales, mais aussi de leur « compatibilité » avec l'organe lui-même.

De nombreux efforts ont été réalisés afin d'identifier des signatures moléculaires pronostiques pour évaluer les individus à risque de développer des métastases. Bien que le transcriptome des tumeurs soit relativement stable au cours de la progression cancéreuse (voir Chap.3, II.1), des analyses d'expression génique ont identifié des gènes impliqués dans la dissémination métastatique au sein des différents organes. Ainsi, des signatures prédictives d'un mauvais pronostic sont décrites (van 't Veer et al., 2002; van de Vijver et al., 2002; Weigelt et al., 2005; Andrews et al., 2010; Lee et al., 2013) et sont commercialisées (MammaPrint[®], Oncotype Dx[®]). Ces tests ont également une valeur prédictive de la réponse des individus aux traitements. L'existence de profils d'expression prédisant la localisation des métastases suggère que ce sont les propriétés intrinsèques des gènes exprimés dans la tumeur primaire qui gouverneraient ce processus (Kang et al., 2003; Allinen et al., 2004; Landemaine et al., 2008). Cependant, une signature ne démontre pas une implication fonctionnelle dans la pathologie, mais une association entre ces profils d'expression et la localisation métastatique. D'autre part, des gènes suppresseurs de métastases ont été identifiés : lorsqu'ils sont surexprimés, ils affectent la dissémination métastatique des cellules tumorales sans altérer la croissance de la tumeur primaire (pour article de revue, (Bohl et al., 2014)). On peut aussi envisager que chaque individu atteint d'un cancer présente une certaine susceptibilité génétique à développer des métastases, susceptibilité qui pourrait être héréditaire et contribuer à la colonisation métastatique.

IV. Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement dans lequel résident les cellules tumorales est également primordial pour la progression tumorale ; les différents types cellulaires qui le constituent influencent non seulement le développement normal des cellules épithéliales mammaires, comme vu précédemment (voir Chap.1), mais aussi la croissance, la différenciation, et la polarité des cellules néoplasiques. Le microenvironnement participe incontestablement à la progression tumorale au cours de laquelle il subit de multiples modifications structurelles, cellulaires et fonctionnelles au bénéfice des cellules épithéliales. Celles-ci recruteraient le stroma et interagiraient avec lui pour développer un microenvironnement permissif à la tumorigenèse et à la colonisation métastatique. Deux expériences élégantes menées par Maffini et al. illustrent son importance cruciale : la transformation

tumorale de cellules épithéliales mammaires de rat a lieu uniquement dans un stroma préalablement exposé à des carcinogènes (Maffini et al., 2004), tandis qu'un stroma normal limite la formation de carcinome et stimule une croissance canalaire normale (Maffini et al., 2005), démontrant que le microenvironnement est capable de reprogrammer des cellules épithéliales cancéreuses. D'autres études ont mis en évidence des altérations de l'expression génétique dans les cellules stromales du microenvironnement au cours des différents stades de l'évolution tumorale : cellules normales, DCIS et IDC (Allinen et al., 2004; Ma et al., 2009). Contrairement aux cellules tumorales mammaires qui ne montrent que très peu de variation au cours de la transition DCIS à IDC, des gènes associés aux composants de la MEC, des MMPs, du cycle cellulaire sont surexprimés dans les cellules du stroma.

Certains changements d'expression génique au sein des cellules du microenvironnement ont une valeur pronostique. Une signature de seulement 26 gènes exprimés dans les cellules du stroma est associée à des différences significatives dans la survie d'individus atteints d'un cancer du sein (Finak et al., 2008). Plus encore, certaines modifications d'expression génique dans les cellules stromales ont une valeur prédictive de la réponse aux chimiothérapies néoadjuvantes dans les cancers RO- (Farmer et al., 2009).

Le microenvironnement tumoral est composé de fibroblastes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de cellules immunitaires et inflammatoires et de cellules adipeuses baignant dans la MEC. Les cellules tumorales modifient elles-mêmes leur microenvironnement en sécrétant des facteurs de croissance (le FGF, le VEGF (vascular endothelial growth factor), le EGFR, des cytokines, le TGF β) qui activent et recrutent les fibroblastes, entraînant une réponse inflammatoire. La MEC est donc un réservoir de facteurs de croissance qui stimulent la prolifération et l'invasion tumorale. Les carcinomes furent décrits par Hal Dvorak comme « des blessures qui ne guériraient jamais » (Dvorak, 1986).

Au sein du microenvironnement tumoral, les fibroblastes activés, les myofibroblastes expriment AML (actine musculaire lisse), des facteurs de croissance et des protéases (Toullec et al., 2010). Ils stimulent la progression tumorale en favorisant l'angiogenèse, la prolifération, la survie, l'invasion et ainsi la dissémination métastatique des cellules tumorales (Pollard, 2004; Kalluri and Zeisberg, 2006). Au niveau cellulaire, les myofibroblastes sécrètent CXCL12 qui agit sur son récepteur CXCR4 au niveau des cellules épithéliales pour promouvoir leur prolifération, migration et invasion (Orimo et al., 2005).

Les vaisseaux sanguins et lymphatiques sont essentiels à la dissémination des cellules tumorales. Dans la plupart des cas, les ganglions lymphatiques axillaires drainant la tumeur primaire sont envahis bien avant la détection de métastases secondaires. L'angiogenèse est essentielle au développement des tumeurs en fournissant les nutriments nécessaires (oxygène et facteurs de

croissance) à leur croissance, mais aussi en représentant la voie principale de dissémination métastatique.

La réponse inflammatoire, caractérisée notamment par une infiltration des lymphocytes, des macrophages et des neutrophiles, participe à l'initiation et à la progression tumorale. L'inflammation favorise la prolifération et la survie des cellules cancéreuses mais aussi l'angiogenèse, le processus métastatique, l'immunité, et elle réduit la réponse aux agents thérapeutiques. Les cellules inflammatoires produisent des cytokines, des facteurs de croissance, des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène entraînant un stress oxydatif, mais aussi des MMPs qui amplifient les signaux inflammatoires, provoquant ainsi une instabilité génétique (pour article de revue, (Colotta et al., 2009). Les macrophages associés au carcinome participent à l'angiogenèse et à la métastase (Luo et al., 2006) et facilitent l'intravasation des cellules dans les vaisseaux sanguins (Wyckoff et al., 2007).

Enfin, les cellules myoépithéliales normales sont capables *in vitro* d'inhiber la croissance tumorale (Hu et al., 2008). La perte des cellules myoépithéliales stimule la transition DCIS vers IDC mais le mécanisme est très peu connu. Les cellules myoépithéliales associées à un DCIS présentent - en comparaison du tissu normal - une diminution d'expression des gènes impliqués dans la différenciation myoépithéliale et une augmentation des gènes stimulant la tumorigenèse tels que ceux codant certaines CXCL.

V. Modèles d'étude

Les modèles d'étude cherchent à rendre compte de la complexité et de l'hétérogénéité des cancers du sein - un vrai défi - afin d'étudier la biologie du développement et de la progression tumorale. Un modèle unique ne peut suffire, et une approche intégrée à de multiples systèmes est indispensable. Hormis les modèles induits par une exposition à des carcinogènes (dont nous ne discuterons pas ici), différents modèles ont été développés : les lignées cellulaires, les modèles murins non transgéniques et les souris génétiquement modifiées (pour articles de revue, (Vargo-Gogola and Rosen, 2007; Holliday and Speirs, 2011). Nous nous concentrerons plus particulièrement sur ceux que j'ai utilisés au cours de ma thèse.

V.1. Les lignées cellulaires

Diverses lignées cellulaires de carcinomes mammaires ont été développées à la fois à partir de tumeurs primaires humaines mais aussi murines. Elles permettent d'étudier les capacités prolifératives, d'adhésion, apoptotiques, migratoires et invasives des cellules tumorales, ainsi que les voies de signalisation sous-jacentes. Elles peuvent aussi servir de modèle préclinique pour tester

certaines thérapies et comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents aux réponses thérapeutiques.

Elles présentent de nombreux avantages : elles se multiplient rapidement, peuvent être génétiquement modifiées et sont facilement manipulables. Cependant, la dérivation de ces lignées cellulaires en culture est inévitable, la culture cellulaire entraîne une certaine sélection : les modifications aléatoires qu'elles acquièrent entraînent la formation de différentes variantes d'une même lignée cellulaire à travers la communauté scientifique, compliquant les comparaisons entre les études scientifiques (Burdall et al., 2003). Les lignées peuvent être cultivées en deux ou trois dimensions, où leur environnement diffère complètement du microenvironnement tumoral. En deux dimensions, les cellules épithéliales luminales adoptent une morphologie en « pavé » tandis que les cellules basales ont une morphologie allongée. En trois dimensions, les cellules peuvent adopter quatre grands types de morphologie : rondes, en masse, en grappe ou en étoiles (Shaw et al., 2004). Les cultures tridimensionnelles sont plus physiologiques que les cultures bidimensionnelles et peuvent être hétérotypiques, permettant d'étudier les interactions des cellules tumorales avec divers types cellulaires du microenvironnement tumoral (macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales).

V.1.1. Les lignées cellulaires humaines

De nombreuses lignées humaines ont été dérivées à partir de tumeurs mammaires primaires à des stades avancés de la maladie, mais beaucoup l'ont été à partir de métastases (effusion pleurale) (Cailleau et al., 1978; Ethier et al., 1993). Ces lignées proviennent donc de stades avancés dans la progression tumorale. La première lignée tumorale décrite fut BT-20 en 1958 (Lasfargues and Ozzello, 1958) ; la lignée MCF7, dérivée en 1973 par Soule et al (Soule et al., 1973), est une des plus couramment utilisée car elle est hormonosensible. Certaines caractéristiques moléculaires et cliniques de différentes lignées de carcinomes mammaires humaines sont récapitulées dans la Table 7.

Les différentes lignées humaines reflètent en partie l'hétérogénéité observée dans les tumeurs primaires ; elles ont notamment l'avantage de récapituler les différents sous-types décrits dans les cancers du sein basal et luminal. Les altérations génomiques et profils génétiques semblent conservés entre la tumeur primaire et la lignée cellulaire qui en dérive, bien qu'elles présentent aussi d'importantes différences ; par exemple les sous-types luminal A et B ne peuvent pas être distingués dans les lignées cellulaires correspondantes. A l'inverse, pour le sous-type basal, c'est à partir des lignées que deux grands types : basal A et basal B, furent décrits (Neve et al., 2006; Kao et al., 2009; Hollestelle et al., 2010).

Lignée cellulaire	Sous-type	Immunoprofile	Source	Age (années)
MCF7	Luminal A	RO+, RP+, HER2-	Effusion pleurale	69
T47-D	Luminal A	RO+, RP+, HER2-	Effusion pleurale	54
BT-474	Luminal B	RO+, RP+, HER2	Tumeur primaire	60
ZR-75	Luminal B	RO+, RP-, HER2-	Ascites	47
SK-BR3	HER2	RO-, RP-, HER2	Effusion pleurale	43
MDA MB-453	HER2	RO-, RP-, HER2	Effusion pleurale	48
MDA MB-231	Basal	RO-, RP-, HER2-	Effusion pleurale	51
SUM 149	Basal	RO-, RP-, HER2-	Carcinome inflammatoire	-

Table 7 | Caractéristiques moléculaires et cliniques de différentes lignées de carcinomes mammaires humains. Adapté de (Neve et al., 2006; Kao et al., 2009).

V.1.2. La lignée murine 4T1

Une des lignées mammaires murines les plus connues est la lignée 4T1. En 1992, Cheryl Aslakson et Fred Miller ont caractérisé et dérivé plusieurs lignées de carcinomes mammaires à partir d'une unique tumeur spontanée développée chez une souris BALB/c (Miller et al., 1983; Aslakson and Miller, 1992). Ainsi, cinq lignées tumorigéniques ont émergé : trois lignées non métastatiques les 67NR, les 168FARN et les 4TO7 et deux lignées métastatiques les 4T1 et les 66cl4. *In vivo*, la dissémination des lignées non métastatiques est hétérogène : les 67NR sont restreintes à la tumeur primaire, les 168FARN sont détectées dans les ganglions lymphatiques, les 4TO7 sont retrouvées au niveau des poumons mais n'y forment pas une tumeur secondaire. Les cellules 4T1 sont hautement métastatiques et capables de développer plusieurs tumeurs secondaires dans divers organes hôtes.

V.2. Modèles murins non transgéniques

V.2.1. Greffes

Chez la souris, des cellules tumorales de différentes origines peuvent être injectées directement dans le coussin adipeux au niveau de la quatrième paire de glande mammaire ou encore en sous-cutanée au niveau du flanc. Une tumeur primaire se développe, sa croissance peut être évaluée en mesurant sa taille et elle pourra donner naissance à des métastases, généralement pulmonaires, à l'inverse de l'homme où les ganglions lymphatiques, le foie, les os et le cerveau sont envahis.

Des lignées cellulaires humaines ou encore une pièce d'une tumeur primaire provenant d'une patiente peuvent être greffées au sein d'une souris immunodéficiente : c'est une xénogreffe (pour article de revue, (Cariati et al., 2011)). La xénogreffe permet de maintenir des tumeurs par transplantation sériée sur de longues périodes et s'avère très utile pour le développement de nouvelles thérapies. Le désavantage majeur de cette approche est l'absence d'un système immunitaire compétent chez les souris receveuses alors que, comme abordé précédemment (voir Chap.3, IV), ce dernier joue un rôle majeur dans le développement et la progression tumorale. L'injection des cellules tumorales directement dans le coussin adipeux est plus physiologique qu'une injection réalisée en sous-cutané bien que les stromas mammaires murin et humain diffèrent énormément. Ainsi, des fibroblastes ou encore des macrophages humains peuvent être co-injectés, on parle de coussin adipeux « humanisé » (Fleming et al., 2012).

Parmi les lignées murines utilisées dans les greffes, la lignée 4T1 est couramment utilisée ; elle peut être transplantée dans le coussin adipeux d'une souris BALB/c. La tumeur primaire croît rapidement et donne naissance, entre trois à six semaines, à des métastases dans les poumons, le foie, les os et le cerveau des souris.

V.2.2. Injection dans la veine de la queue

Pour étudier le potentiel métastatique des cellules, celles-ci peuvent être injectées directement dans la veine de la queue des souris : c'est la « tail-vein injection ». Cette expérience permet d'étudier à la fois la survie des cellules dans la circulation, mais aussi leurs capacités de colonisation métastatique. Plusieurs jours après l'injection, les poumons des souris sont analysés et les métastases énumérées. La lignée 4T1 peut être introduite dans la veine de la queue, ou encore, dans l'artère carotide droite, les métastases pulmonaires se forment en une à deux semaines.

L'utilisation de cellules exprimant la luciférase permet d'étudier la croissance tumorale ainsi que l'invasion métastatique *in vivo* chez l'animal vivant anesthésié (Tao et al., 2008).

V.3. Les modèles murins génétiquement modifiés

Bien que plus de cent modèles murins sont décrits, pour lesquels des souris ont été génétiquement modifiées pour exprimer spécifiquement dans le tissu mammaire des oncogènes (*ERBB2*, *MYC*, le virus polyoma PyVT) ou encore pour supprimer des gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*, *BRCA1*, *PTEN*) (Borowsky, 2007), ils ne semblent décrire qu'une petite partie de l'hétérogénéité observée dans les carcinomes mammaires humains.

Les gènes codants pour les oncogènes se trouvent sous le contrôle du promoteur MMTV (mouse mammary tumour virus) ou encore WAP (whey acidic protein), ce qui permet leur expression dans les cellules épithéliales mammaires (Wagner et al., 1997). Ces promoteurs permettent une expression dans l'ensemble des canaux galactophoriques de la glande mammaire adulte vierge et sont régulés par les hormones ; l'expression augmente durant la gestation et la lactation. Ces promoteurs sont sélectifs d'un type cellulaire dans la glande mammaire mais pas strictement spécifiques à la glande mammaire ; le MMTV induit une expression dans les poumons, les reins, les glandes salivaires, les testicules et la prostate (Henrard and Ross, 1988) ; le WAP conduit, lui, à une expression à faible niveau dans de nombreux tissus dont le cerveau (Wen et al., 1995). Sous le contrôle de ces promoteurs, l'expression d'un gène peut varier en fonction du lieu d'intégration dans le génome et reste donc difficile à contrôler (Dobie et al., 1996). Ceci peut donc entraîner des effets périphériques, altérant potentiellement l'initiation et la progression tumorale.

V.3.1. Le modèle MMTV-PyVT

Un des modèles murins couramment utilisé est le modèle MMTV-PyVT (polyoma virus middle T protein) (Guy et al., 1992; Lin et al., 2003). L'antigène T est une protéine attachée à la membrane plasmique et n'est pas exprimé dans les tumeurs humaines. Il assure sa fonction d'oncogène en interagissant et en activant de nombreuses kinases de la famille SRC et Ras et la sous unité p85 de la PI3K, entraînant l'activation des voies de prolifération et de migration cellulaire accompagnée d'une inhibition de l'apoptose (similaires aux voies de signalisation activées dans le sous-type HER2) (Dankort and Muller, 2000; Marcotte and Muller, 2008).

La progression tumorale chez le modèle MMTV-PyVT est schématisée dans la Figure 15. A quatre ou six semaines, 60% des souris exprimant le PyVT développeront une hyperplasie qui évoluera durant la puberté en adénome et enfin en carcinome entre huit à douze semaines de vie (Lin et al., 2003). A sept ou huit semaines, les souris ont développé plusieurs tumeurs, qui métastasent potentiellement dans leurs poumons. Au début de leur progression, les carcinomes sont morphologiquement semblables aux DCIS humains de type luminal avec une invasion stromale précoce de grade intermédiaire ou haut. A dix semaines, 50% des carcinomes seront dénommés « de

stade avancé », similaires aux IDC peu différenciés. L'expression des RO et RP augmente lors du développement de l'adénome et diminue au cours de la transition DCIS à IDC (les carcinomes de stade avancé sont négatifs pour les RP). L'expression de l'oncogène HER2 augmente au cours de la progression tumorale. On observe une augmentation de l'expression de cycline D1 au cours de la transition adénome vers carcinome et de la transition carcinome précoce à carcinome avancé, ainsi que la perte d'expression de la β -intégrine. La cinétique de la progression tumorale varie en fonction du fond génétique murin (Freund et al., 1992). Par exemple, le fond génétique FVB, dans lequel fut développé le modèle, est plus sensible à la tumorigenèse mammaire que le fond C57Bl/6J (Lifsted et al., 1998). Des croisements F1 entre ces deux fonds génétiques retardent l'apparition des tumeurs.

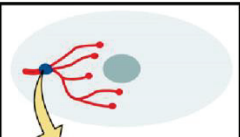
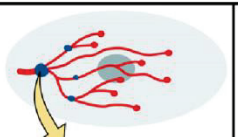
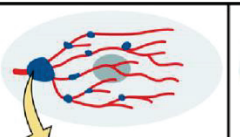
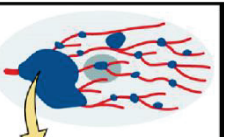
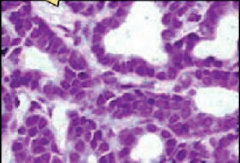
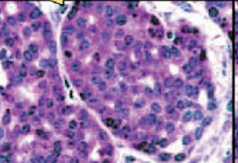
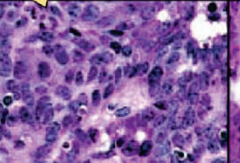
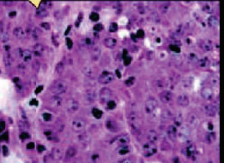
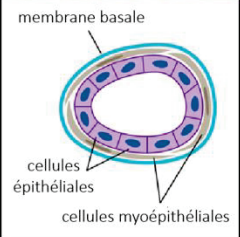
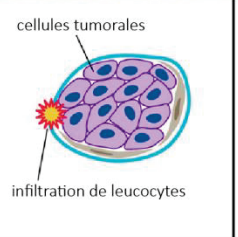
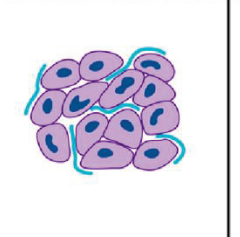

	Hyperplasie	Adénome	Carcinome débutant	Carcinome avancé
Glande mammaire				
H&E				
Morphologie cellulaire				
Biomarqueurs	RO ++ RP + HER2- Cyclin D1 + Integrin β \pm	RO +++ RP ++ HER2 \uparrow Cyclin D1 + Integrin β \pm	RO ++ RP \pm HER2 $\uparrow\uparrow$ Cyclin D1 ++ Integrin β -	RO \pm RP- HER2 $\uparrow\uparrow\uparrow$ Cyclin D1 +++ Integrin β -

Figure 15 | Schéma de la progression tumorale chez le modèle de cancer du sein MMTV-PyVT.

Adapté de (Lin et al., 2003). H&E, hématoxyline et éosine.

V.3.2. Les modèles conditionnels

D'une part, certains modèles conditionnels ont été développés afin d'activer ou de supprimer respectivement des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs à des âges spécifiques (avant/durant la puberté, chez la glande mature, gestante/lactante). Récemment, un modèle fut développé où les expressions de la recombinaise cre et de l'oncogène PyVT, sous le contrôle du promoteur MMTV, sont régulées par la doxycycline (Rao et al., 2014).

D'autre part, contrairement aux carcinomes humains qui s'initient au sein de quelques cellules présentes dans les UTDs, les oncogènes vont donc s'exprimer dans toutes les cellules canalaire.

L'avenir se trouve sûrement dans des modèles de carcinogenèse mammaire conditionnel qui permettent de cibler un nombre restreint de cellules épithéliales et non l'ensemble de l'arbre galactophorique (Du et al., 2006).

En conclusion, la carcinogenèse mammaire fait intervenir de nombreuses fonctions cellulaires complexes nécessaires et indispensables à l'envahissement de tissus secondaires. Enfin, bien que ne représentant sûrement pas l'actuelle hétérogénéité des cancers du sein, les modèles d'études existants sont extrêmement hétérogènes et permettent, non seulement d'étudier la biologie de la progression tumorale, mais aussi de tester différentes approches thérapeutiques.

Chapitre 4. La maladie de Huntington et la protéine huntingtine

La maladie de Huntington (MH) est causée par la présence d'une mutation dans la protéine huntingtine (HTT). Cette maladie sera décrite brièvement dans un premier temps avant d'aborder la protéine HTT: son profil d'expression, ses localisations subcellulaires diverses ainsi que certaines de ses fonctions.

I. Découverte de la maladie de Huntington

I.1. Une protéine à répétitions CAG

La MH, une maladie neurodégénérative rare, porte le nom du médecin américain Georges Lee Huntington qui l'a décrite en 1872 (Figure 16) (*Medical and Surgical Reporter of Philadelphia*, 13 avril 1872). En 1983, la MH fut associée à un marqueur polymorphique identifié sur le haut du bras court du chromosome 4 (Gusella et al., 1983). Ce ne sera qu'en 1993 que le gène qui code la HTT (HTT), protéine dont la mutation est à l'origine de la MH, sera découvert. Il s'agit du gène *IT15* (Interesting Transcript) situé sur le chromosome 4p16.3 (1993), aujourd'hui renommé gène *HTT* (HTT).

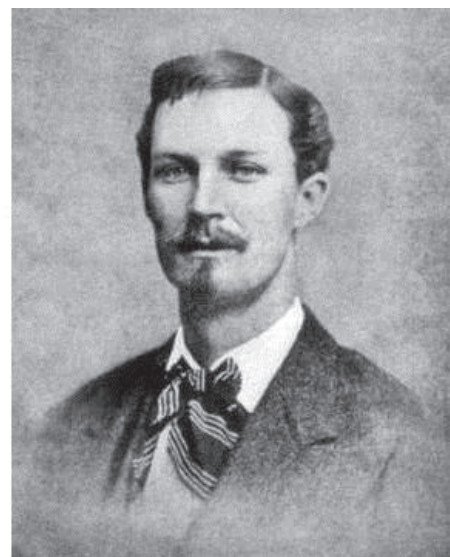
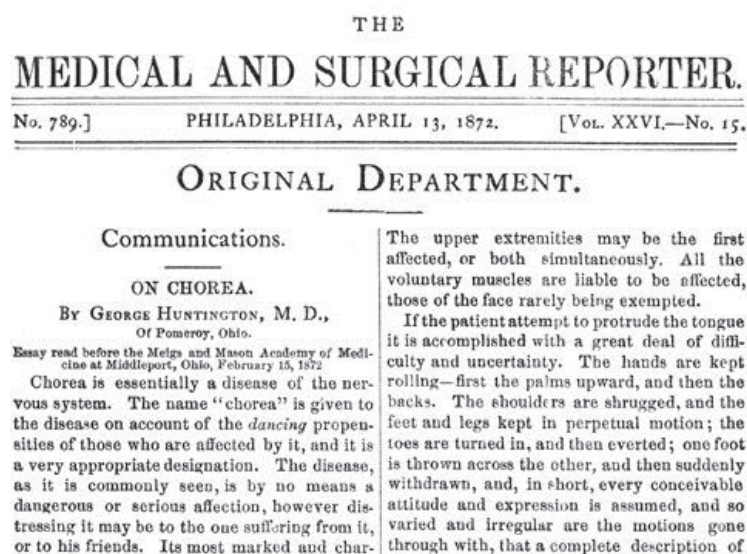


Figure 16 | Première page du journal « Medical and Surgical Reporter of Philadelphia ».

Publiée le 13 avril 1872 avec Georges Huntington, né en 1850 – décédé en 1916.

Telles que certaines ataxies spinocérébelleuses et la maladie de Machado-Joseph, la MH est une maladie caractérisée par une expansion instable de triplets de nucléotides CAG (Cytosine-Adénosine-Guanine) dans la région codante d'un gène cible. Bien que sa prévalence soit estimée aujourd'hui de 5 à 8,4 pour 100 000 (Tassicker et al., 2009; Morrison et al., 2011; Evans et al., 2013), c'est la plus fréquente des maladies neurodégénératives à répétitions CAG. De récentes études indiquent que sa prévalence est largement sous-estimée ; au Canada, elle a été estimée à 13,7 pour

100 000 dans la population globale et à 17,3 pour 100 000 dans la population caucasienne (Fisher and Hayden, 2014). Ces études utilisent des modèles d'estimation pour étendre les observations faites à partir de populations à risque pour la MH ou atteintes de la MH à une population complète ; aucune étude à ce jour n'a réellement étudié le polymorphisme de répétitions CAG dans une population qui n'est pas à risque pour la MH.

Le gène *HTT* codant la protéine HTT est composé de 67 exons chez les vertébrés répartis sur 210 kilobases ; c'est au niveau de l'exon 1, que se situe une répétition polymorphique de triplet CAG (1993). Cette dernière se traduit au niveau N terminal de la protéine de 348kDa par une expansion de glutamines (polyQ ; forme mutante : HTT-m). Lorsque la répétition excède un seuil (≥ 36), elle entraîne le développement de la MH, une maladie autosomique dominante (Figure 18). Chez un individu n'ayant pas la MH, le nombre moyen de répétitions est autour de 17. Entre 27 et 35 répétitions, l'allèle est défini comme « intermédiaire » (AI, allèle intermédiaire) bien que non pathologique pour la MH par définition. Entre 36 et 39 répétitions, la pénétrance est réduite et la maladie se déclare plus tardivement. A partir de 40 répétitions, la pénétrance de la maladie est entière (Rubinsztein et al., 1996 ; Mcneil et al, 1997). Un test génétique permet de dépister la présence de la mutation dans les leucocytes des individus testés.

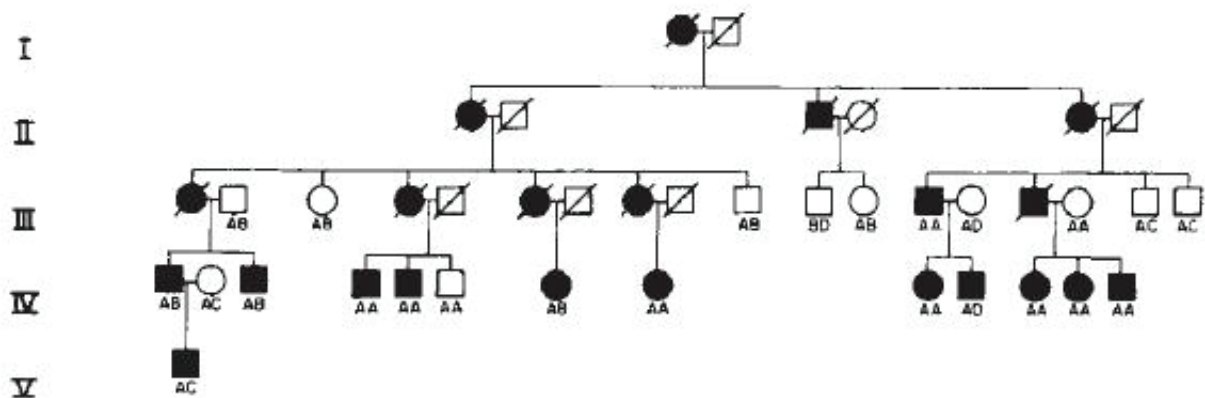


Figure 17 | Exemple d'un arbre généalogique d'une famille atteint de la maladie de Huntington.

Les carrés représentent des hommes et les ronds des femmes ; la couleur noire représente les individus atteints de la MH (adapté de (Gusella et al., 1983)).

I.2. Symptômes et physiopathologie de la maladie de Huntington

Les symptômes de la MH apparaissent à l'âge adulte, assez tardivement entre 30 et 40 ans, à l'exception des formes juvéniles qui peuvent se déclarer chez les enfants. La MH est caractérisée par trois types de symptômes : psychiatriques, cognitifs et moteurs. Les individus vivent des troubles psychiatriques dont des troubles de l'humeur (dépression, anxiété), des dépendances, des tentatives

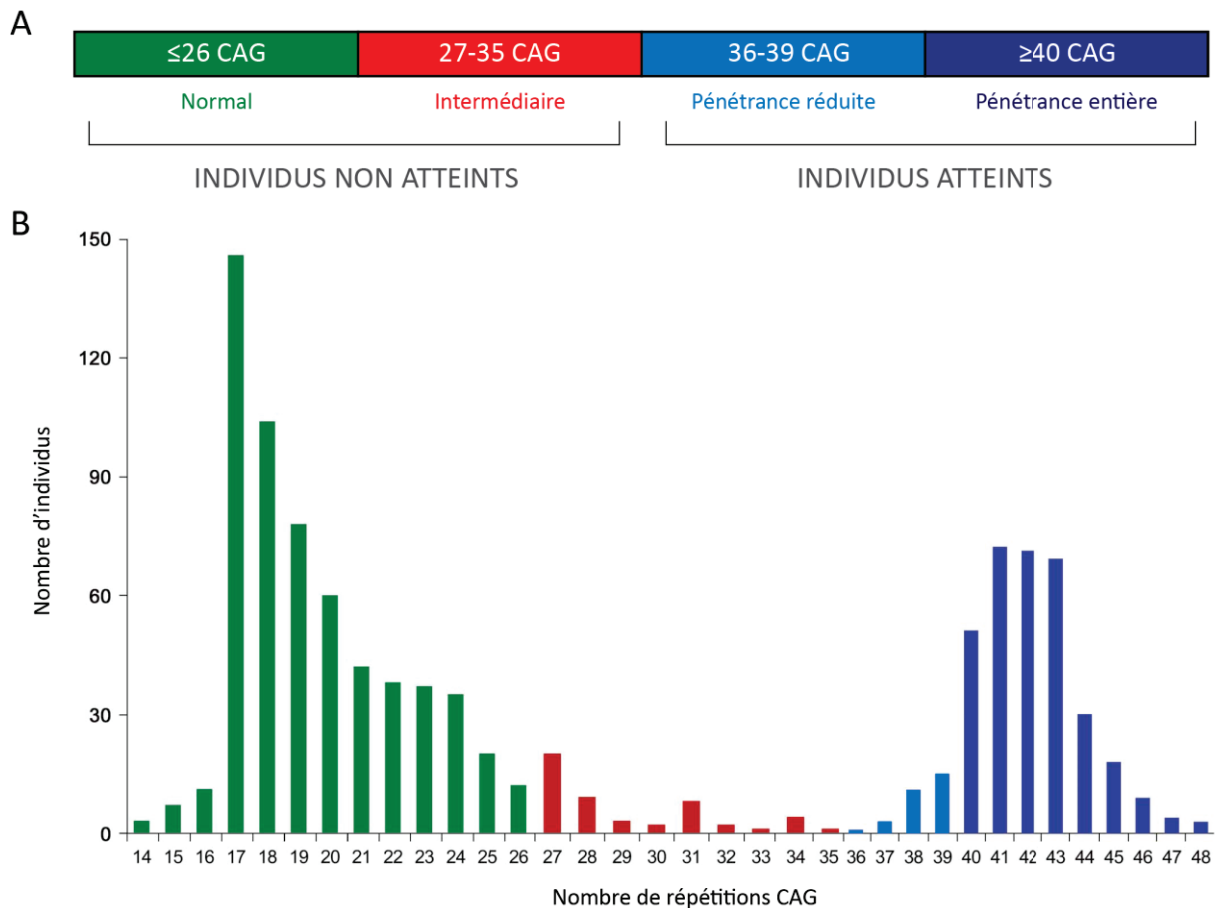


Figure 18 | Nombre de répétitions CAG et maladie de Huntington.

(A) Représentation schématique des variations de longueur de répétitions CAG dans la *HTT* (adapté de (Semaka et al., 2006)). (B) Distribution du nombre de répétitions CAG dans la population PHAROS (Prospective Huntington At Risk Observational Study cohort) (Killoran et al., 2013).

de suicide, de la schizophrénie. Ceci est accompagné d'une diminution progressive des fonctions cognitives (troubles de l'attention, concentration, mémoire). Des mouvements involontaires spontanés et saccadés atteignent également toutes les parties du corps (Figure 19A). Ces mouvements choréiformes augmentent en amplitude avec l'évolution de la maladie. Cela provoque une perte d'autonomie de la personne atteinte ; la détérioration intellectuelle pouvant aboutir à un état de démence. Généralement, les individus atteints de la MH décèdent suite à des complications secondaires telles que des infections ou des insuffisances cardiaques (pour articles de revue, (Borrell-Pages et al., 2006; Walker, 2007; Ross and Tabrizi, 2011)). Il n'existe à ce jour aucun traitement pour retarder l'apparition et la progression des symptômes de cette maladie.

La MH entraîne une atrophie importante du cerveau qui peut perdre jusqu'à 30% de sa masse. La physiopathologie de la MH se caractérise bien avant l'apparition des premiers symptômes par une neurodégénérescence des neurones situés dans le noyau caudé et le putamen dans les ganglions de la base (Vonsattel et al., 1985; Aylward et al., 2004). Ce sont majoritairement les neurones épineux - contenant du GABA (gamma-aminobutyric acid neurotransmitter - et de l'énképhaline) jouant un rôle

important dans le contrôle des mouvements volontaires, qui dégénèrent en premier lieu et par la suite, les neurones corticaux (Figure 19B). En effet, avec l'évolution de la maladie, on observe une atrophie sévère du néocortex cérébral (couches III, V, et VI) ; certaines autres régions du cerveau sont aussi affectées notamment l'hippocampe, le thalamus, le noyau subthalamique, le globus pallidus, la substance noire, la substance blanche et le cervelet. Une des caractéristiques de la MH est la formation d'inclusions nucléaires et cytoplasmiques contenant la HTT et la HTT-m dans plusieurs régions du cerveau. Cependant, la densité des inclusions n'est pas corrélée avec les dysfonctions cellulaires et la mort cellulaire. Les inclusions pourraient avoir un effet protecteur en débarrassant la cellule de la HTT mutante soluble, très toxique sous cette forme (pour articles de revue, (Borrell-Pages et al., 2006; Walker, 2007; Ross and Tabrizi, 2011)). A l'heure actuelle, il est admis que la neurodégénérescence induite par la présence de la HTT-m est à la fois due à la perte de fonctions neuroprotectrices de la protéine sauvage mais aussi au gain de nouvelles fonctions toxiques de la protéine mutée.

La MH n'est pas uniquement une maladie du cerveau. En effet, les individus présentent des symptômes périphériques, incluant une perte de poids, une atrophie musculaire, des problèmes cardiaques et de l'ostéoporose (van der Burg et al., 2009) (Figure 19C). Certains de ces symptômes apparaissent précocement et peuvent contribuer à la mortalité des individus. De plus en plus d'études suggèrent que ces manifestations périphériques ne sont pas uniquement secondaires et dépendantes des dysfonctions neurologiques, mais qu'elles pourraient être dues directement à la présence de la protéine mutée dans des tissus périphériques.

I.3. Nombre de répétitions CAG et maladie de Huntington

I.3.1. Au-delà de 39 répétitions : pénétrance complète

La majorité des individus atteints présentent plus de 40 répétitions et il existe une forte corrélation entre l'âge d'apparition, la sévérité de la maladie et le nombre de répétitions CAG (Andrew et al., 1993a; Rosenblatt et al., 2006) (Figure 20). Plus la répétition est longue, plus l'âge d'apparition des premiers symptômes sera avancé et leur évolution rapide. Le nombre de répétitions expliquerait 50 à 70% de la variation observée dans l'âge d'apparition de la maladie, suggérant la participation d'autres facteurs environnementaux et/ou génétiques. Les formes juvéniles se caractérisent généralement par 80 à 100 répétitions avec quelques cas exceptionnels présentant jusqu'à 240 CAG (Nance et al., 1999).

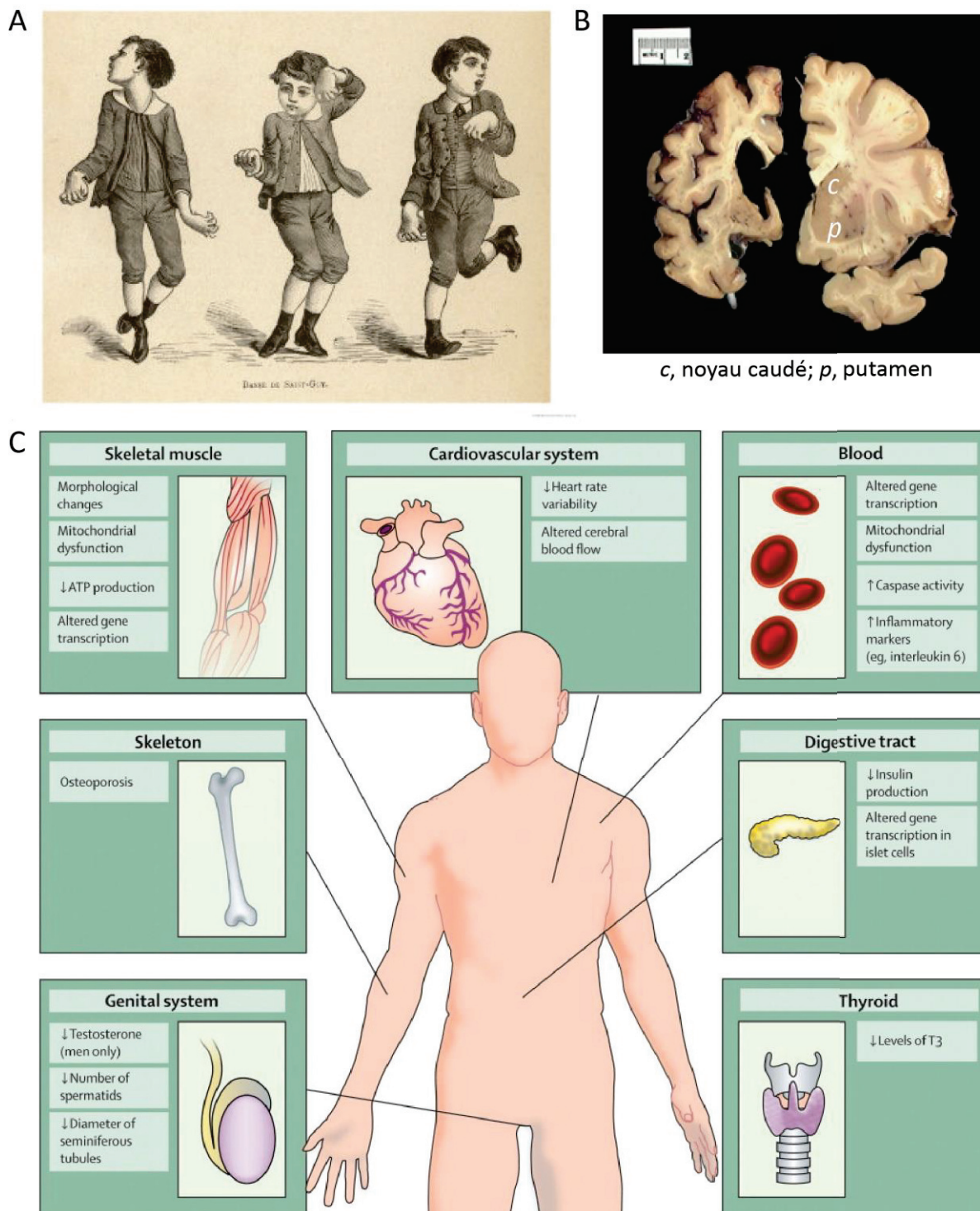


Figure 19 | La maladie de Huntington.

(A) Illustration de la danse de Saint-Guy que l'on confondait avec la MH au moyen-âge. (B) Coupes de cerveaux *post mortem* d'un individu atteint de la MH (à gauche) et d'un individu sain (à droite). On peut observer une sévère atrophie du noyau caudé et du putamen ainsi que du cortex cérébral. (C) Pathologie périphérique des individus atteints de la MH (de Van der Beerg, 2009).

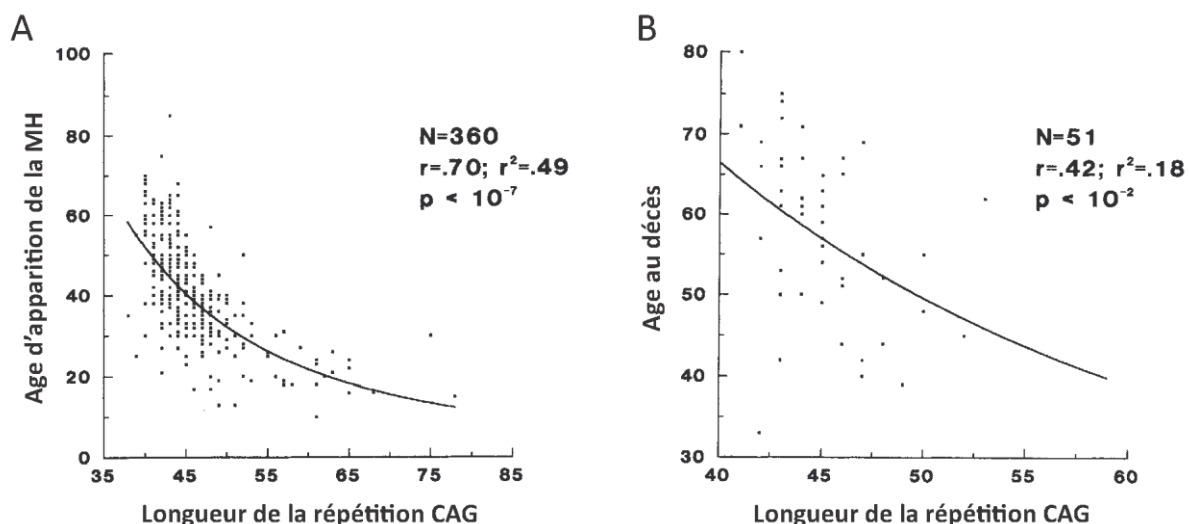


Figure 20 | Longueur de la répétition CAG et caractéristiques cliniques des individus atteints de la MH. Corrélation de la longueur de la répétition CAG avec (A) l'âge d'apparition de la MH et (B) l'âge du décès chez les individus atteints de la MH (Andrew et al., 1993a).

Les répétitions CAG de la *HTT* sont très instables à la fois dans les lignées germinales mais aussi dans les lignées somatiques. En effet, l'instabilité germinale est caractérisée par une anticipation génétique entraînant une augmentation du nombre de répétitions au cours des générations. Cet effet est plus important lors d'une transmission paternelle ; en effet, l'instabilité germinale des répétitions est observée durant la spermatogenèse (Duyao et al., 1993). Elle s'accompagne d'un accroissement de la sévérité des symptômes associé à la diminution de l'âge d'apparition des premiers symptômes. Au fur et à mesure des générations, les enfants de parents atteints développent souvent la maladie à des âges plus précoces. Cette instabilité germinale du nombre de répétitions CAG est commune aux maladies à répétitions de trinuécléotides (Pearson et al., 2005). D'autre part, l'instabilité somatique entraîne une augmentation du nombre de triplet dans certaines cellules et tissus spécifiquement. Au cours de la MH, elle est particulièrement observée dans les zones affectées par la *HTT-m* à la fois dans des modèles murins, mais aussi chez des individus atteints de la MH (Telenius et al., 1994; De Rooij et al., 1995; Mangiarini et al., 1997). Il a été suggéré que cette instabilité somatique participerait à la spécificité de la neurodégénérescence induite par la *HTT-m*. Ainsi, ces répétitions CAG sont instables à la fois entre générations, mais aussi au sein d'un même organisme.

1.3.2. De 36 à 39 répétitions : pénétrance incomplète

Certains porteurs d'une mutation allant de 36 à 39 répétitions ont développé la MH, généralement à des âges avancés, mais d'autres porteurs de ce nombre de répétitions n'ont pas été

affectés par la maladie (Rubinsztein et al., 1996; McNeil et al., 1997). Cette pénétrance incomplète indique que d'autres facteurs environnementaux et/ou génétiques doivent être impliqués dans son apparition ou/et encore que les personnes n'ont pas vécu assez longtemps pour la développer.

I.3.3. De 27 à 35 répétitions : allèles intermédiaires

Un AI est défini comme portant une répétition de CAG comprise entre 27 et 35 : cette répétition est plus grande que ce qui est généralement observé dans la population, mais plus petite que celle associée à la MH ; elle peut s'étendre et devenir ≥ 36 en une génération seulement (1998; Semaka et al., 2006; Semaka and Hayden, 2014). On estime à 3,9% le nombre d'individus présentant un AI dans le gène de la *HTT* (Maat-Kievit et al., 2001).

Les AI ont été décrits pour la première fois lors de l'étude de familles avec des mutations *de novo* de la *HTT* (Goldberg et al., 1993; Myers et al., 1993). Golderg et Myers avaient alors observé que les parents non atteints d'enfants porteurs présentaient des AI. En effet, un AI confère une instabilité germinale et peut être étendue vers un nombre de répétitions pathologiques, lors d'une transmission paternelle (Maat-Kievit et al., 2001). Les porteurs de AI peuvent donc transmettre à leur descendance une forme mutée de *HTT*. La limite de ce groupe (27) a donc été définie comme étant respectivement la plus petite répétition entraînant une transmission ≥ 36 répétitions en une unique génération.

Pendant longtemps, la communauté scientifique s'accordait sur l'absence d'implication clinique des AI chez les individus porteurs. Cependant, des études de cas récentes ont suggéré l'apparition de la MH ou de manifestations cliniques chez certains individus porteurs de ces allèles (Groen et al., 2010; Ha and Jankovic, 2011). D'une part, des facteurs génétiques et environnementaux pourraient expliquer le développement de la MH uniquement chez certains individus présentant un AI. D'autre part, l'instabilité somatique du nombre de répétitions CAG pourrait participer à l'apparition de la MH (Swami et al., 2009). Hormis ces études de cas, dans une cohorte de 1001 individus à risque pour la MH, Killoran et al. ont dernièrement comparé les caractéristiques cliniques des individus avec une AI à ceux des individus présentant des allèle sauvages ou encore un allèle muté (Figure 18). 5.1% de la population étudiée qui présentait une AI avait les mêmes résultats en terme moteur, cognitif et fonctionnel que la population normale. Néanmoins, ces individus sont plus déprimés, apathiques, et présentent plus de pensées suicidaires, similairement aux individus atteints de la MH (Killoran et al., 2013). Les auteurs suggéraient alors que les individus porteurs d'une AI pourraient présenter une forme prodromale de la MH et ainsi en présenter certains symptômes. D'autres études sont nécessaires pour évaluer le phénotype induit par la présence de ces AI, ainsi que leur lien de causalité avec un développement tardif de la MH.

II. La huntingtine : généralités

Le gène codant la HTT a été découvert il y a maintenant 20 ans et, étant donné la nature des symptômes de la MH, la majeure partie des recherches s'est principalement concentrée sur les propriétés toxiques de la forme mutée de la protéine dans le cerveau. Plus récemment, les fonctions de la protéine sauvage ont été étudiées. La HTT est une grosse protéine soluble de 348kDa contenant 3144 acides aminés qui est bien conservée au cours de l'évolution. En dehors des répétitions de glutamines polymorphiques communes à d'autres protéines, elle ne présente pas d'homologie de séquence avec d'autres protéines connues.

II.1. Expression et localisation de la huntingtine

L'expression de la HTT est ubiquitaire (Figure 21) : on la trouve dans toutes les cellules humaines et mammifères avec une prédominance dans le cerveau et dans les testicules. Plusieurs études se sont intéressées à l'expression de la protéine dans des tissus de rongeurs et des tissus humains (la plupart atteints de la MH). Dans le système nerveux, la HTT est particulièrement exprimée dans les ganglions de la base, le cortex et l'hippocampe. Parmi les tissus humains non neuronaux exprimant la HTT, on trouve les testicules, le colon, le foie, le pancréas, les poumons, le placenta, les muscles et le cœur (Li et al., 1993; Strong et al., 1993; Gutekunst et al., 1995; Trottier et al., 1995; Metzler et al., 2000). La plus grande description de l'expression de la HTT dans différents tissus est répertoriée dans la base de données Human Protein Atlas (pour article de revue, (Moreira Sousa and Humbert, 2013)). L'expression de la HTT semble mosaïque au sein des tissus, son niveau d'expression varie au sein d'un même tissu en fonction du type cellulaire. Moreira Sousa et al. ont notamment observé que les cellules de type épithélial présentent des niveaux d'expression de HTT plus importants que les cellules de type mésenchymal (Moreira Sousa and Humbert, 2013). Les fibroblastes de la peau, les adipocytes mammaires, les cellules stromales de l'utérus présentent peu ou pas d'expression de HTT en comparaison des cellules épithéliales mammaires et aux cellules squameuses de la peau par exemple.

La HTT est présente à la fois au niveau cytoplasmique et nucléaire (Kegel et al., 2002), mais elle est aussi associée à de nombreux organites subcellulaires tels que l'appareil de Golgi, les microtubules (Hoffner et al., 2002), les vésicules de transport (DiFiglia et al., 1995), les vésicules d'endocytose, les mitochondries ou encore le réticulum endoplasmique. La HTT peut être associée aux phospholipides de la membrane plasmique bien qu'aucune localisation membranaire dans des cellules épithéliales n'ait été décrite à ce jour (Kegel et al., 2005).

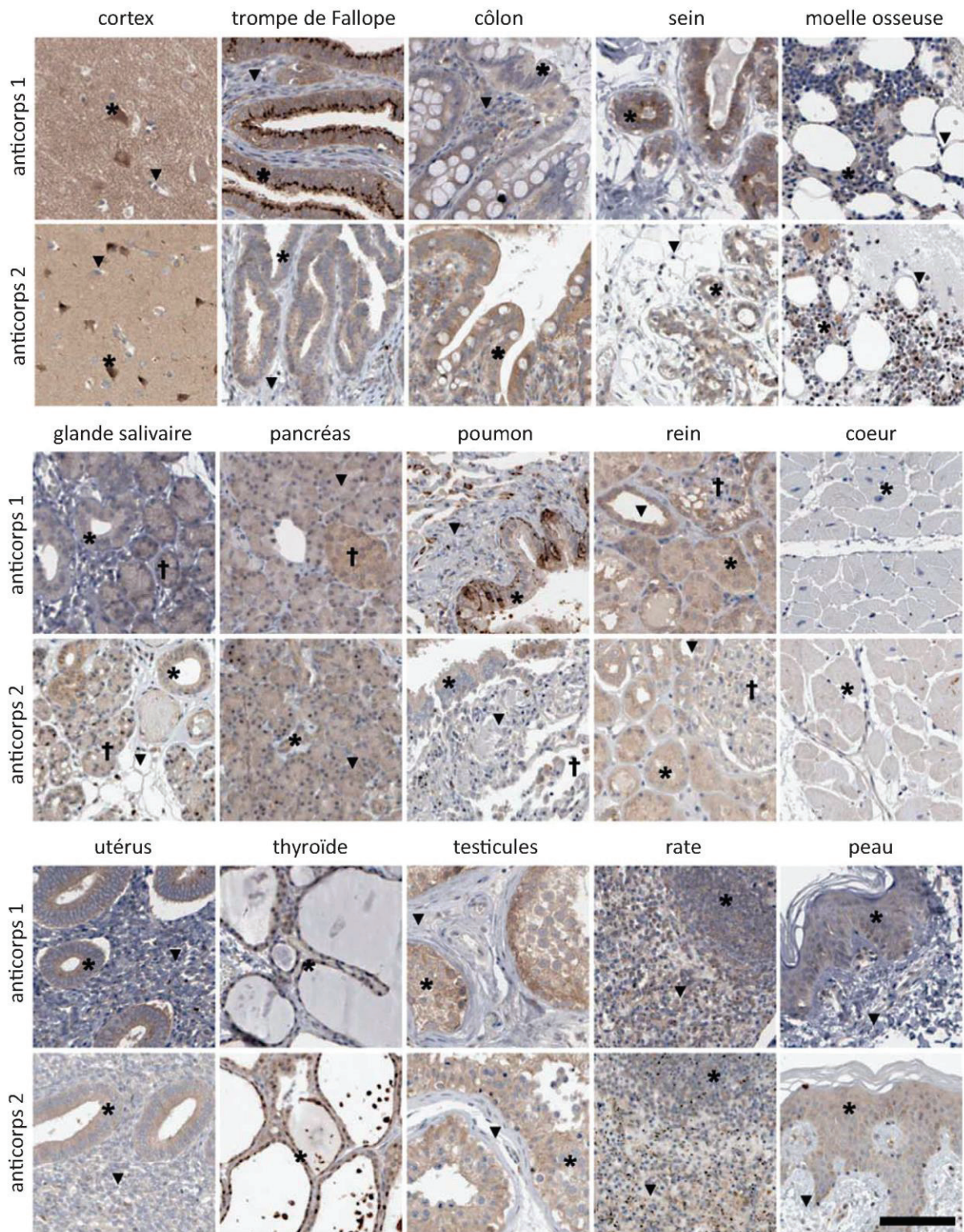


Figure 21 | Patron d'expression de la HTT dans divers tissus sains.

Immunohistochimie avec deux anticorps dirigés contre la HTT (anticorps 1 : MAB2166, anticorps 2 : HPA025114). Expression dans le cortex (*neurones, ↓cellules gliales), dans la trompe de Fallope (*cellules glandulaires, ↓tissu conjonctif), côlon (*cellules glandulaires, ↓lamina propria), sein (*cellules glandulaires, ↓adipocytes), moelle osseuse (*cellules hématopoïétiques, ↓adipocytes), glande salivaire (*cellules glandulaires, ↓adipocytes, tacini sécrétoires), pancréas (*canaux, ↓îlots de Langerhans, †acini), poumon (*bronchioles, ↓tissu conjonctif, †alvéole), rein (*tubules proximaux, ↓tubules distaux, †glomérule), cœur (*myocytes), utérus (*cellules glandulaires, ↓stroma), thyroïde (*cellules glandulaires), testicules (*canaux séminifères, ↓tissu conjonctif), rate (*pulpe blanche, ↓pulpe rouge) et peau (*épithélium squameux, ↓tissu conjonctif). Bar d'échelle de 100µm. Adapté de (Moreira Sousa and Humbert, 2013).

II.2. Aspects structuraux de la huntingtine

Du fait de son importante masse moléculaire, aucune étude de cristallographie n'a pu jusqu'alors mettre en évidence sa structure. Certaines études suggèrent qu'elle pourrait présenter une structure tertiaire semblable à un solénoïde (Li et al., 2006). La HTT est enrichie, particulièrement à son niveau N-terminal, en répétitions HEAT (huntingtin elongator factor 3, PR65/A regulatory subunit of protein phosphatase 2A, and TOR1), impliquées dans les interactions protéines-protéines (Figure 22)(Li et al., 2006). En bon accord avec la présence de ces domaines, elle interagit avec de nombreuses protéines impliquées dans diverses fonctions cellulaires qui seront abordées plus tard dans ce chapitre (voir Chap.4, III). La répétition de glutamines commence au 18^{ème} acide aminé et est adjacente à un domaine riche en proline (polyP). La HTT contient aussi dans sa partie C-terminale une séquence d'export nucléaire (NES, nuclear export signal) ainsi qu'une séquence d'import nucléaire (NLS) moins active dans sa partie N-terminale suggérant que la HTT pourrait être impliquée dans le transport entre le noyau et le cytoplasme (Xia et al., 2003; Desmond et al., 2012).

La HTT présente plusieurs sites de clivages par des protéases pouvant générer des fragments de tailles variables. Parmi ces protéases, on peut citer les caspases, les capaines, les endopeptidases, les métalloprotéinases. La HTT est notamment clivée par :

- (1) la caspase 3 *in vitro* aux acides aminés 513 et 552 (Wellington et al., 2000),
- (2) la caspase 2 à l'acide aminé 552 (Hermel et al., 2004),
- (3) la caspase 6 à l'acide aminé 586 (Wellington et al., 2000),
- (4) les calpaïnes aux acides aminés 469 et 536 (Kim et al., 2001),
- (5) la MMP-10 à l'acide aminé 402 (Miller et al., 2010).

Un des mécanismes clés de la pathologie de la MH est le clivage de la HTT-m en des fragments plus courts que la HTT-m pleine longueur. Ces fragments de clivage contenant l'expansion anormale de glutamines sont plus toxiques pour les neurones que la forme mutée entière (Kim et al., 2001; Gafni and Ellerby, 2002 ; Wellington et al., 2002). En effet, la protéolyse de la HTT-m est accrue au cours de la MH et elle indispensable à sa toxicité (Wellington et al., 2000; Gafni et al., 2004 ; Graham et al., 2006). L'expression de fragments de clivages de la HTT-m contenant la mutation est suffisante pour modéliser certains aspects pathologiques de la MH (Mangiarini et al., 1996). En bon accord, des fragments clivés de la HTT-m sont retrouvés accumulés dans les cerveaux post-mortem des individus atteints de la MH (Mende-Mueller et al., 2001 ; Wellington et al., 2002 ; Wang et al., 2008). Cependant, la ou les protéases impliquées dans la protéolyse de la HTT-m au cours de la MH ne sont que peu décrites dans la littérature scientifique. D'autre part, le clivage de la HTT sauvage a été observé bien que son rôle reste inconnu à ce jour (Goffredo et al., 2002).

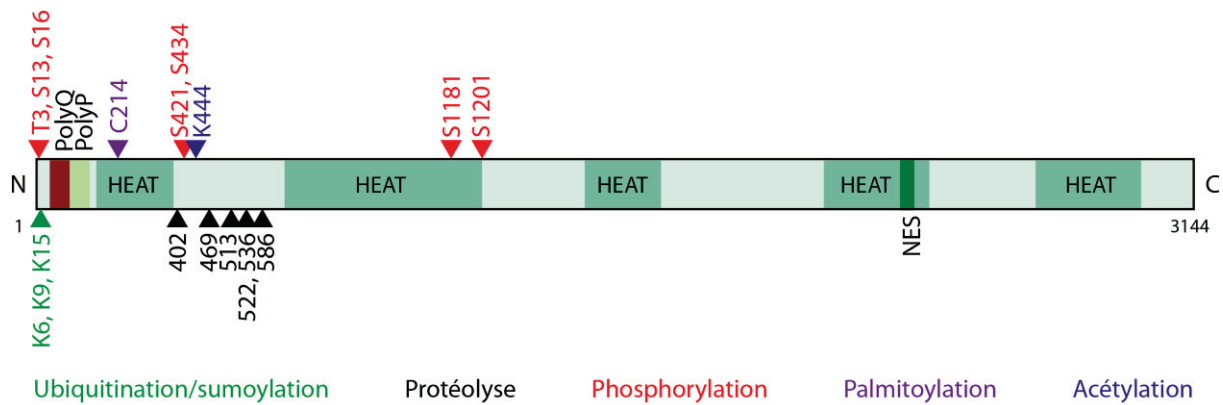


Figure 22 | Représentation schématique de la séquence protéique de la HTT.

HEAT : répétition HEAT ; NES : séquence d'export nucléaire. Adapté de (Ross and Tabrizi, 2011; Zheng and Diamond, 2012).

II.3. Modifications post-traductionnelles de la huntingtine

La HTT subit de nombreuses modifications post-traductionnelles qui régulent ses fonctions, ses localisations et sa stabilité (Figure 22).

- (1) Elle peut être ubiquitinylée. Cette ubiquitinylation régule sa dégradation (Kalchman et al., 1996).
- (2) Elle peut être sumoylée aux lysines N-terminales K6, K9 et K15 (Steffan et al., 2004). Ces sumoylations pourraient augmenter la stabilité de la protéine et accélérer la neurodégénérescence.
- (3) Elle peut être palmitoylée à la cystéine 214 par HIP14 (huntingtin interacting protein 14) (Yanai et al., 2006). La palmitoylation, permettant d'avoir une localisation aux membranes, est une modification trouvée communément chez les protéines impliquées dans le contrôle du trafic vésiculaire, et qui est essentielle à leur fonction.
- (4) Elle peut-être acétylée à la lysine 444. Cette acétylation provoque la dégradation de la HTT par autophagie (Jeong et al., 2009). Dans le contexte de la MH, l'acétylation pourrait être protectrice en permettant de limiter l'accumulation de la protéine, inhibant alors la toxicité de la protéine mutée.
- (5) Elle peut être phosphorylée à plusieurs sites.
 - Parmi eux, la sérine 421 de la HTT a été montrée comme phosphorylée par AKT et elle est impliquée dans la toxicité de la protéine mutante (Humbert et al., 2002). Cette modification sera abordée plus tard dans ce chapitre (voir Chap.4, IV).
 - CDK5 phosphoryle la HTT aux sérines 1181 et 1201 (Anne et al., 2007). Ces phosphorylations sont protectrices vis-à-vis de la toxicité de la protéine mutée. D'autre part, l'absence de ces phosphorylations dans un modèle murin de la MH diminue l'anxiété et augmente la neurogenèse hippocampale en modulant le transport axonal du BDNF (brain derived neurotrophic factor) dans l'hippocampe (Ben M'Barek et al., 2013).

II.4. Les partenaires de la huntingtine

Plus de 300 partenaires protéiques de la HTT ont été décrits en utilisant diverses techniques telles que la technique de double hybride, les méthodes d'affinité couplées à la spectrométrie de masse, la spectrométrie de masse en tandem (Goehler et al., 2004; Kaltenbach et al., 2007; Culver et al., 2012; Shirasaki et al., 2012). Certaines interactions furent confirmées par la suite mais d'autres restent hypothétiques. Ces partenaires font parties de classes fonctionnelles : les dynamiques intracellulaires, la dégradation des protéines, le cytosquelette, et régulation de la transcription, etc. Certains d'entre eux, sélectionnés en fonction de leur intérêt par rapport à mes travaux de thèse, sont classés selon leur fonction biologique dans la Table 8.

III. Fonctions de la huntingtine

L'expression temporellement et spatialement hétérogène de la HTT, ainsi que la diversité de ses partenaires, illustrent la complexité que représente la compréhension des fonctions de cette protéine. Aujourd'hui, la HTT est vue comme une protéine d'échafaudage permettant de coordonner l'assemblage de complexes multi-protéiques afin d'effectuer de multiples fonctions cellulaires affectant de nombreux processus physiologiques, la plupart de ces fonctions ayant été décrites dans le système nerveux au cours du développement, mais aussi à l'âge adulte. Par exemple, la HTT est indispensable durant l'embryogenèse : une inactivation de son expression chez des souris provoque une létalité prématurée à 7,5 jours de vie embryonnaire après la gastrulation (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). L'ablation de l'expression de la HTT spécifiquement dans le cerveau entraîne une neurodégénérescence progressive des neurones striataux, corticaux et hippocampaux, indiquant que la HTT possède un rôle protecteur (Dragatsis et al., 2000). La HTT est impliquée à la fois dans la neurogenèse embryonnaire mais aussi adulte (Godin et al., 2010a; Ben M'Barek et al., 2013; Molina-Calavita et al., 2014).

Comment la HTT peut-elle réguler ces processus physiologiques ? Quelles sont les fonctions cellulaires associées à la HTT et responsables de ces phénotypes ? De nombreuses études se sont intéressées aux dysfonctions cellulaires induites par la protéine mutée dans le contexte de la MH et ces études ont associé les dérégulations observées à des pertes de fonctions de la protéine et à des gains de fonctions associés à la présence de la mutation. Cependant, peu d'études ont spécifiquement été consacrées aux rôles de la HTT sauvage. Nous discuterons ici des fonctions cellulaires décrites pour la HTT sauvage et comment, le cas échéant, ces fonctions sont affectées lorsque la HTT est mutée. Parmi ces fonctions, la régulation de la transcription et les dynamiques intracellulaires au sens large seront les mieux décrites.

Gène	Nom du gène	Fonctions
Apoptose/Mort cellulaire		
HIP1	Huntingtin interacting protein 1	Endocytose, pro-apoptotique
API5	Apoptosis inhibitor 5	Inhibiteur de l'apoptose
Dégradation des protéines		
HIP2	Huntingtin interacting protein 2	Dégradation des protéines
PSMD4	Proteasome 26S subunit, non-ATPase, 4	Proteasome
Organisation du cytosquelette		
TUBG1	Tubulin, gamma 1	Structure, transport
ACTB	B-actin	Structure, transport
Dynamique intracellulaire		
DCTN2	Dynactin 2 (p50)	Transport
DNCH1	Dyneine, cytoplasmic 1, heavy chain 1	Transport
DN1L1	Dynein, axonemal, light intermediate chain 1	Transport
DNM2	Dynamin 2	Endocytose
HIP1	Huntingtin interacting protein 1	Endocytose, pro-apoptotique
HAP1	Huntingtin associated protein 1	Transport, endocytose
AP2A1	Adaptin, alpha 1	Endocytose
TUBG1	Tubulin, gamma 1	Transport
CLH-17	Clathrin, heavy chain	Endocytose
Métabolisme/Energie		
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase	Enzyme de la glycolyse
PKM2	Pyruvate kinase	Enzyme de la glycolyse
Régulation de la transcription/Maintenance de l'ADN		
CBP	cAMP-response element binding protein binding protein	Co-activateur
REST	Repressor Element-1 Transcription Factor	Répresseur
TP53	Tumor suppressor p53	Facteur de transcription
NFKB1	Nucleor factor-kappa B	Facteur de transcription
BARD1	BRCA1 associated ring domain protein 1	Réparation de l'ADN
BRCA2	Breast cancer 2	Réparation de l'ADN
Signalisation cellulaire		
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase, sous-unité régulatrice 1 (p85 α)	Récepteur voie AKT
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase, sous-unité régulatrice 2 (p85 β)	Récepteur voie AKT
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase, sous-unité régulatrice 3 (p55 α)	Récepteur voie AKT
AKT/PKB	Protéine kinase B	Kinase
SGK	Sérum glucocorticoïde kinase	Kinase
CIP4	Protéine interagissant avec CDC42	Voie de signalisation CDC42
CDK5	Cycline-dépendante kinase	Kinase

Table 8 | Tableau représentant certains partenaires de la HTT.

Adapté de (Goehler et al., 2004; Kaltenbach et al., 2007; Culver et al., 2012; Shirasaki et al., 2012).

III.1. Transcription

La HTT est présente dans le noyau et interagit avec de multiples facteurs de transcription et des protéines régulant la transcription comme REST/NRSF (Repressor Element-1 Transcription Factor/Neuron Restrictive Factor) (Zuccato et al., 2003), CBP (cAMP-response element binding protein) (Steffan et al., 2000), le facteur nucléaire NF- κ B (Takano and Gusella, 2002) ainsi que P53 (Steffan et al., 2000).

Lorsqu'il est présent dans le noyau, REST/NRSF interagit avec des séquences consensus NRSE (Neuron-Restrictive Silencer Elements), localisées dans les promoteurs des gènes, et inhibe la transcription des gènes qui possèdent ces séquences. La HTT séquestre REST/NRSF dans le cytoplasme, l'empêchant d'accomplir sa fonction d'inhibiteur de la transcription et favorise ainsi la transcription de certains gènes neuronaux dont le BDNF (Zuccato et al., 2003). En situation pathologique, la HTT-m ne peut plus lier REST/NRSF, augmentant l'activation de NRSE et donc la répression de l'expression de gènes sous le contrôle de cette régulation.

CBP est un co-activateur transcriptionnel qui régule l'acétylation/déacétylation des histones, et le contrôle subséquent de facteurs de survie neuronaux. P53 régule positivement l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, les réponses au stress cellulaire et les réparations de l'ADN. En interagissant avec P53 et CBP, la HTT inhibe la transcription de leurs gènes cibles.

III.2. Dynamiques intracellulaires

Bien que présente dans le noyau, la HTT est principalement localisée dans le cytoplasme des cellules neuronales où elle favorise le transport vésiculaire de cargos le long des microtubules (Trottier et al., 1995; Gunawardena et al., 2003; Gauthier et al., 2004; Anne et al., 2007; Caviston et al., 2007). Elle interagit avec les microtubules et avec les vésicules de transport au vu de son interaction directe avec la chaîne intermédiaire de la dynéine (Caviston et al., 2007) et HAP1 (huntingtin associated protein 1) (Li et al., 1995) qui elle-même interagit avec la kinésine (McGuire et al., 2006) et la sous unité P150^{Glued} de la dynactine (Li et al., 1998). Dans les neurones, la kinésine est majoritairement impliquée dans le transport vésiculaire antérograde du corps cellulaire aux extrémités des neurites et axones, tandis que la dynéine assure un transport vésiculaire rétrograde, de l'extrémité plus des microtubules (au niveau des axones et des neurites) jusqu'à leur extrémité moins.

La HTT est impliquée dans le transport vésiculaire axonal du BDNF, un facteur neurotrophique, du cortex jusqu'au striatum (Gauthier et al., 2004) mais aussi d'autres protéines cargos telles que

APP (amyloid precursor protein) (Colin et al., 2008). Les neurones striataux ne synthétisent pas de BDNF, indispensable à leur fonction et survie, celui-ci leur est fourni par les neurones corticaux (Altar et al., 1997). En effet, le BDNF est transporté de façon antérograde du corps cellulaire aux synapses le long des axones cortico-striataux (Altar et al., 1997; Baquet et al., 2004). Alors que la HTT sauvage favorise ce transport, cette fonction est altérée par la mutation polyQ qui entraîne un déficit du transport du BDNF occasionnant une neurotoxicité (Gauthier et al., 2004). En plus de la régulation du transport vésiculaire du récepteur du BDNF, la HTT régule de même le transport rétrograde du récepteur du BDNF, TrkB, dans les dendrites striatales vers le noyau des neurones striataux. Par son interaction avec la dynéine et TrkB, la HTT favorise l'attachement des vésicules contenant TrkB aux microtubules. En condition mutante, cet attachement est altéré et est à l'origine d'un déficit de ce transport (Liot et al., 2013).

Une autre fonction de la HTT liée au transport vésiculaire est de coupler la production d'ATP à sa consommation, qui est indispensable aux activités des moteurs moléculaires (Zala et al., 2013). Par l'intermédiaire de son interaction avec l'enzyme de la glycolyse, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la HTT amène GAPDH aux vésicules permettant une production locale d'ATP. Ainsi, les vésicules sont énergétiquement autonomes et elles peuvent alors acquérir des vitesses de transport importantes.

Le rôle de la HTT dans le transport est régulé par ses phosphorylations aux sérines 421, 1181 et 1201. Nous discuterons plus tard de la phosphorylation à la sérine 421 (voir Chap.4, IV). Lorsque la HTT n'est pas phosphorylée aux sérines 1181 et 1201, le transport axonal du BDNF est augmenté, ce qui induit une augmentation du relargage et de la production de BDNF dans les neurones de l'hippocampe (Ben M'Barek et al., 2013). Dans des souris knock-in modifiées pour ces sites de phosphorylation, l'augmentation de BDNF, en absence de phosphorylation, a pour conséquence physiologique une maturation accrue des neurones hippocampaux associée à une diminution du comportement anxio-dépressif des souris.

La forme sauvage de la HTT a été impliquée dans la régulation de la ciliogenèse par l'interaction entre HAP1 et PCM1 (pericentriolar material 1), protéine essentielle à la ciliogenèse (Keryer et al., 2011). La HTT participe au transport de PCM1 vers la base du cil. La déplétion de la HTT affecte le trafic rétrograde de PCM1, réduisant ainsi la ciliogenèse. En condition pathologique, PCM1 s'accumule au niveau du centrosome et est associé à la formation de cils plus longs entraînant une altération du flux du fluide cérébrospinal dans des modèles murins de la MH.

La HTT est aussi impliquée dans l'endocytose : elle interagit avec la dynamine, les clathrines, l' α -adaptine, AP-2 (adaptor protein 2), Rab-11 et HIP-1 (huntingtin interacting protein 1) (Kalchman et al., 1997 ; Wanker et al., 1997 ; Waelter et al., 2001 ; Li et al., 2008). HIP-1 favorise l'endocytose dépendante des clathrines en participant à l'invagination membranaire et l'assemblage du manteau

de clathrine. La HTT localise à la membrane Rab11, impliqué dans le recyclage des vésicules d'endocytose et ainsi, participe à l'activation de Rab11 (Li et al., 2008).

III.3. Division cellulaire

La HTT a été impliquée dans l'organisation du fuseau mitotique lors de la division cellulaire (Figure 23)(Godin et al., 2010a; Molina-Calavita et al., 2014). La HTT est localisée au niveau des deux pôles du fuseau mitotique par son interaction avec un complexe macromoléculaire contenant la sous-unité P150^{Glued} de la dynactine et la dynéine, deux régulateurs indispensables à la formation et à l'orientation du fuseau mitotique (Godin et al., 2010a). Au moment où le fuseau mitotique s'oriente, NuMA (nuclear mitotic apparatus protein) interagit avec le complexe dynactine/dynéine et LGN (leucine-glycine-asparagine enriched protein) au niveau de l'extrémité plus des microtubules, permettant ainsi leur ancrage au cortex cellulaire (Zheng et al., 2010; Peyre et al., 2011). Au cours de ce processus, la HTT participe au recrutement de certains de ces acteurs clés de l'orientation du fuseau mitotique. La diminution de la HTT sauvage ou la présence de la HTT mutée induisent notamment une dispersion de P150^{Glued}, de la dynéine et de NuMA des pôles du fuseau mitotique et du cortex cellulaire entraînant une altération de l'angle de division du fuseau mitotique (Godin et al., 2010a) (Molina-Calavita et al., 2014). De plus, la dynamique des microtubules est altérée par la HTT-m ; ces derniers persistent anormalement après contact avec la membrane plasmique et continuent de s'accroître tangentiellement à la membrane plasmique. Nous verrons plus tard (Annexes, Article 4) que la HTT participe également au transport du complexe dynéine/dynactine vers le cortex cellulaire.

Quelles peuvent-être les conséquences physiologiques d'une telle fonction de la HTT ? Chez la souris, la déplétion de la HTT soit par électroporation *in utero* d'ARN interférant, soit par un système cre/lox, ou encore l'expression de la HTT-m conduit à une diminution du nombre de progéniteurs et une augmentation de cellules qui partent en différenciation (Godin et al., 2010a; Molina-Calavita et al., 2014). En effet, la déplétion de la HTT favorise une division avec un fuseau mitotique parallèle à la zone ventriculaire au profit de ceux se divisant avec un fuseau oblique ou horizontal par rapport à la zone ventriculaire, générant ainsi moins de cellules progénitrices. Chez les souris modèles pour la MH, on observe une diminution de l'épaisseur de la couche corticale (Molina-Calavita et al., 2014). Ces résultats démontrent que, par son rôle central au cours de la division cellulaire, la HTT sauvage est impliquée dans la neurogenèse embryonnaire avec des conséquences fonctionnelles lorsqu'elle est mutante.

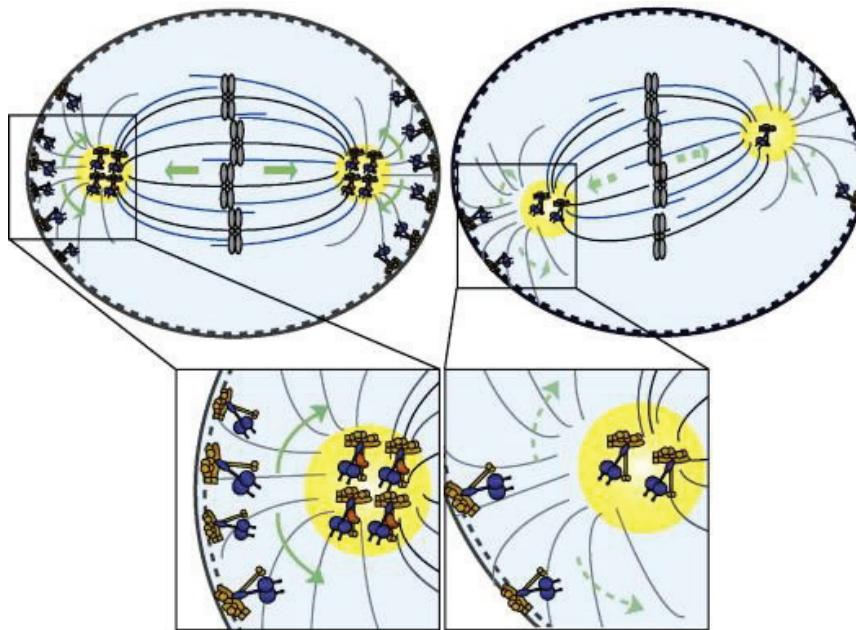


Figure 23 | La HTT régule l'orientation du fuseau mitotique.

La dynéine et la dynactine sont essentielles à l'ancrage des microtubules aux pôles du fuseau. Au niveau de la zone médiane et du cortex cellulaire, le complexe dynéine/dynactine génère des forces pour assurer un assemblage et positionnement du fuseau. En absence de HTT, le complexe dynéine/dynactine est dispersé du cortex cellulaire et des pôles du fuseau entraînant une altération de l'orientation du fuseau. Dynéine, bleue ; P150^{Glued}, jaune ; HTT, orange (Godin and Humbert, 2011).

III.4. Apoptose

La HTT est impliquée directement dans les processus d'apoptose et de survie cellulaire. *In vitro*, alors qu'une déplétion de la forme sauvage de la HTT est pro-apoptotique dans des neurones en culture, la surexprimer est anti-apoptotique. Parmi les mécanismes pouvant expliquer ces effets anti-apoptotiques, la HTT peut bloquer l'activation de la caspase 3 et 9 (Rigamonti et al., 2000; Zhang et al., 2006). La HTT interagit directement avec la caspase 3 active. La déplétion de la HTT provoque une activation de la caspase 3 et la surexpression de la HTT inhibe l'activité de la caspase 3 (Zhang et al., 2006). De plus, la HTT semble protéger contre de nombreux stimuli apoptotiques tels que la privation en sérum, les activateurs des récepteurs à domaine de mort, et les protéines pro-apoptotiques de la famille BCL2 (B-Cell Lymphoma 2). La HTT semble agir en molécule pro-survie en amont de la caspase 3 et en aval des protéines BCL2 *in vitro* (Rigamonti et al., 2000). La HTT sauvage interagit avec HIP1 et empêche la formation du complexe pro-apoptotique HIP1-HIPP1 (huntingtin interacting protein 1-interacting protein) (Gervais et al., 2002). En présence de la HTT-m, la diminution de l'interaction HIP1-HTT libérerait HIP1 qui activerait la voie d'apoptose extrinsèque et notamment la caspase 8.

IV. La phosphorylation à la sérine 421

IV.1. AKT, SGK, et calcineurine régulent la phosphorylation de la HTT à la sérine 421

La HTT est phosphorylée à la sérine 421 (S421-P-HTT) par la kinase sérine/thréonine AKT aussi appelée la protéine kinase B (Humbert et al., 2002) et par la kinase induite par le sérum et les glucocorticoides SGK (serum- and glucocorticoid-induced kinase) (Figure 24) (Rangone et al., 2004). A l'inverse, trois membres de la famille des sérine/thréonine phosphatases, comprenant la PP1 (protéine phosphatase 1), PP2A (protéine phosphatase 2A) et PP2B (calcineurine), régulées par le calcium/calmodulin, déphosphorylent la HTT à cette position (Pardo et al., 2006; Metzler et al., 2010).

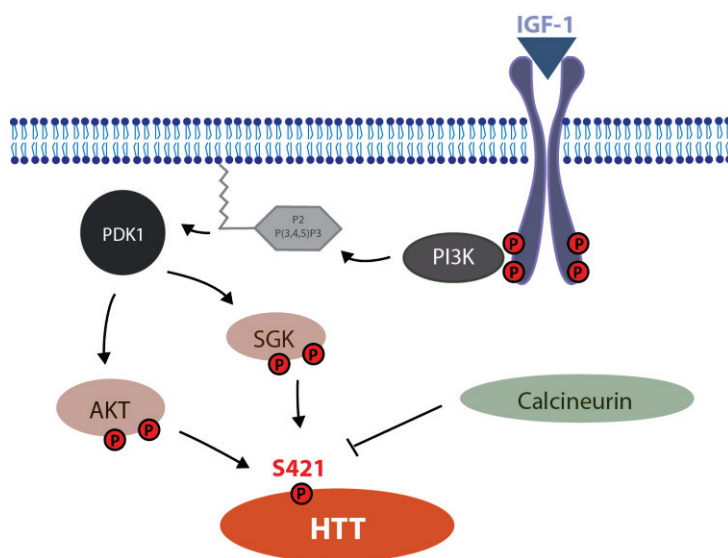


Figure 24 | La phosphorylation à la sérine 421 de la HTT.

La voie IGF-1/PI3K est impliquée dans la phosphorylation de la HTT à la sérine 421. Après fixation de l'IGF-1 sur son récepteur, la PI3K activée phosphoryle les kinases AKT et SGK qui pourront alors en cascade phosphoryler la HTT. A l'inverse, trois membres de la famille des sérine/thréonine phosphatases, comprenant la PP1 (protéine phosphatase 1), PP2A et PP2B (calcineurine), régulées par le calcium, déphosphorylent la HTT à cette position.

La PI3K est un hétérodimère à activité kinase qui présente deux sous-unités : une sous-unité régulatrice, p85 et une sous-unité catalytique p110 (PIK3CA, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha). La fixation de son ligand l'IGF sur son récepteur (IGF-R) entraîne la dimérisation de deux récepteurs permettant leur activation après transphosphorylation. La protéine P85 s'amarre alors à la partie intracellulaire des récepteurs et participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate ((PI3,4,5)P₃). (PI3,4,5)P₃ permet de recruter AKT à proximité de la membrane plasmique en interagissant avec le domaine d'homologie pleckstrin (PH) de AKT et PDK1 (phosphadidyinositol 3-dépendent kinase 1) (Alessi et al., 1997; Andjelkovic et al., 1997). La PDK1 et la PDK2 (phosphadidyinositol 3-dépendent kinase 2) activent AKT en la phosphorylant respectivement à la thréonine 308 et à la sérine 473 (Alessi et al., 1996) mais ces kinases phosphorylent également la thréonine 256 et à la sérine 422 de la SGK (Kobayashi and Cohen, 1999). La structure de SGK est très similaire à celle d'AKT bien qu'elle ne possède pas de domaine PH.

IV.2. Rôles dans la direction du transport vésiculaire

La phosphorylation de la HTT à la sérine 421 contrôle la direction du transport vésiculaire le long des microtubules (Colin et al., 2008). Lorsqu'elle est phosphorylée, la HTT recrute la kinésine-1 sur les vésicules et les microtubules, promouvant le transport antérograde, de l'extrémité moins des microtubules jusqu'à leurs extrémités plus (Figure 25). A l'inverse, quand la HTT n'est pas phosphorylée à la sérine 421, la kinésine-1 se détache et les vésicules se déplacent préférentiellement de façon rétrograde. Le rôle régulateur de la phosphorylation à la sérine 421 n'est pas restreint aux vésicules contenant du BDNF : par exemple, les vésicules contenant APP (amyloid precursor protein) sont soumises à une régulation similaire. La HTT est donc un élément clé pour le contrôle de la direction du transport dans les neurones.

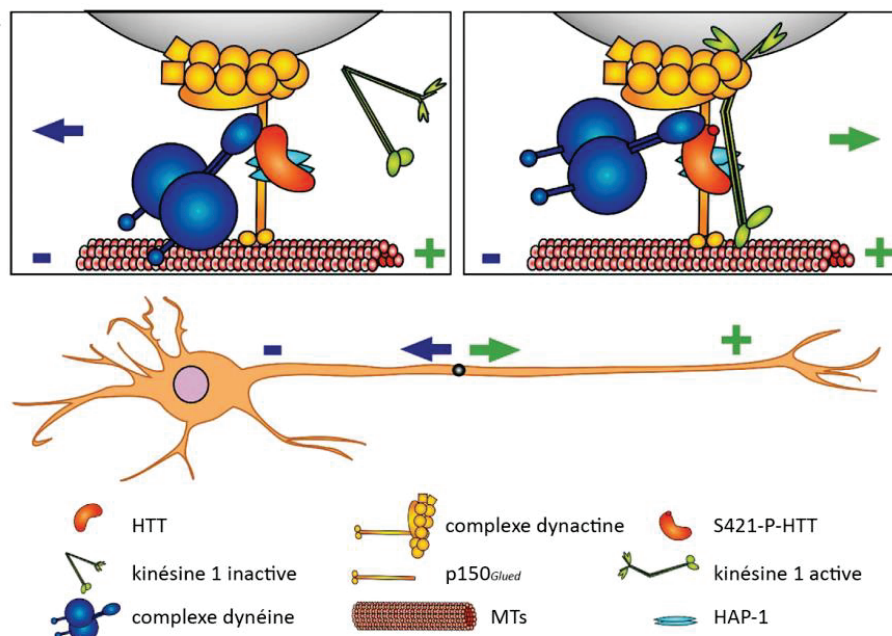


Figure 25 | Régulation de la direction du transport vésiculaire par la S421-P-HTT.

Lorsque la HTT n'est pas phosphorylée, la kinésine-1 se détache des microtubules et des vésicules entraînant un transport rétrograde. Lorsque la HTT est phosphorylée, l'interaction de la kinésine-1 avec le complexe moteur est facilitée et elle est recrutée sur les vésicules, favorisant un transport antérograde.

IV.3. La phosphorylation à la sérine 421 dans la maladie de Huntington

Au cours de la progression pathologique de la MH, on observe une modulation dynamique de la phosphorylation à la sérine 421 (Rangone et al., 2004; Colin et al., 2005; Warby et al., 2005). Dans un premier temps, la phosphorylation de la HTT-m à la sérine 421 est réduite par comparaison avec la HTT sauvage dans des lignées cellulaires et des modèles murins (Warby, Chan et al. 2005). Les niveaux d'expression et d'activation d'AKT sont diminués dans les tissus neuronaux de rongeur modèles pour la MH, mais aussi dans des lymphoblastes et lymphocytes de patients MH (Colin, Regulier et al. 2005). L'activité de la calcineurine – et non les niveaux d'expression protéique – est de

même augmentée dans les cerveaux des modèles murins de la MH (Pineda et al., 2009). Enfin, dans des cerveaux post-mortem d'individus atteints de la MH, l'expression de la forme pleine longueur active d'AKT est diminuée ; cette dernière est clivée par la caspase-3 entraînant l'accumulation d'une forme tronquée inactive d'AKT (Humbert et al., 2002) (Colin, Regulier et al. 2005). A l'inverse, l'expression de SGK est augmentée dans les cerveaux post-mortem d'individus atteints de la MH (Rangone et al., 2004).

La phosphorylation à la sérine 421 de la HTT mutante régule sa toxicité *in vitro* et *in vivo* (Humbert et al., 2002; Rangone et al., 2004; Pardo et al., 2006). Cette phosphorylation diminue la mort neuronale ainsi que la formation toxique d'inclusion nucléaire induites par l'expression de la HTT mutée (Humbert et al., 2002). Ainsi, la surexpression d'une HTT-m mimant une perte de phosphorylation aggrave la mort neuronale tandis que la surexpression d'une HTT-m mimant une phosphorylation constitutive diminue la mort neuronale (Humbert et al., 2002; Pardo et al., 2006). En bon accord, divers traitements permettant d'augmenter la phosphorylation à la sérine 421 sont neuroprotecteurs : les traitements à l'IGF ou l'expression de forme activée d'AKT (Humbert et al., 2002) ; l'expression de forme activée de SGK (Rangone et al., 2004) ; l'inhibition de l'activité de la calcineurine, en utilisant des ARN interférants ou bien un inhibiteur pharmacologique, le FK506 (Pardo et al., 2006) ; l'inhibition des activités des PP1 et PP2A (Metzler et al., 2010).

Comment peut-on expliquer les effets neuroprotecteurs de cette phosphorylation ? Une forme constitutivement phosphorylée de la HTT mutante est aussi efficace à transporter le BDNF que la HTT sauvage (Gauthier et al., 2004)(Zala, Colin et al. 2008). En effet, la phosphorylation de la HTT-m à la sérine 421 rétablit les interactions entre la HTT-m, la dynactine et les microtubules et ce n'est pas le cas lorsque la HTT-m n'est pas phosphorylée. Le FK506 augmente la phosphorylation de la HTT à la sérine 421 et restaure les défauts de transport du BDNF entraîné par la forme mutante de la protéine dans des cultures primaires de neurones et dans des neurones corticaux de rat (Pineda et al., 2009).

D'autres auteurs proposent que la phosphorylation à la S421 joue sur le clivage toxique de la HTT mutante. En absence de phosphorylation à la sérine 421, le clivage de la HTT par la caspase-6 et l'accumulation de fragments N-terminaux dans le noyau des cellules en culture est augmenté (Warby et al., 2009).

Enfin, la phosphorylation à la S421 régule également les dynamiques des microtubules qui sont perturbées par la HTT mutante au cours de la mitose (voir Chap.4, III.3). En effet, mimer une perte de phosphorylation à la sérine 421 sur le HTT-m (S421-A-HTT-m) entraîne les mêmes défauts d'orientation du fuseau mitotique que la HTT-m seule (Molina-Calavita et al., 2014). A l'inverse, une forme mutée de HTT mimant une phosphorylation à la sérine 421 constitutive (S421-D-HTT-m) ainsi qu'une forme active d'AKT rétablit les défauts de division entraînés par la HTT-m.

En conclusion, la HTT est une protéine d'échafaudage aux multiples fonctions. Cette protéine est très complexe à la fois par sa structure moléculaire et ses multiples régulations post-traductionnelles, son expression et ses localisations diverses et variées mais aussi par la nature de ses nombreux partenaires.

Contexte et Objectifs de l'étude

Etant donné la nature des symptômes développés au cours de la MH, la plupart des études dans le domaine se sont intéressées aux propriétés toxiques de la HTT mutée dans le cerveau. Cependant, comme nous l'avons vu, la HTT est exprimée de façon ubiquitaire, elle est indispensable au développement normal, et la perte de ses fonctions contribuent (en plus des gains de fonctions toxiques) à la progression pathologique de la MH.

Dans ce contexte, au cours des dernières années, mon laboratoire d'accueil a poursuivi deux grands axes de recherche. D'une part, il s'est intéressé au rôle de la HTT et des dysfonctions entraînées par la mutation polyQ, au cours de la neurogenèse corticale chez l'embryon mais aussi hippocampale chez l'adulte. D'autre part, le laboratoire s'est investi sur les rôles de la HTT sauvage et mutante dans un autre tissu : la glande mammaire. Celle-ci a été considérée sous un aspect sain et pathologique : la morphogenèse du tissu mammaire a été étudiée ainsi que la carcinogenèse mammaire. Au cours de mon doctorat, je me suis principalement investie dans la caractérisation du rôle de la HTT sauvage dans le cancer du sein.

Étude 1 : “ Huntingtin down-regulation enhances metastasis in breast cancer by regulating of the tight junction protein ZO1 ”

Morgane S. Thion, John Russel McGuire, Cristovao Marques Sousa, Julien Fitamant, Sophie Leboucher, Laetitia Fuhrmann, Sophie Vacher, Sophie Tézenas du Montcel, Ivan Bièche, Agnès Bernet, Patrick Mehlen, Anne Vincent-Salomon, and Sandrine Humbert
En préparation

Nous avons caractérisé les rôles et l'expression de la HTT sauvage dans le cancer du sein (Article 1 des résultats). L'étude s'est organisée autour de quatre grands axes :

- (1) Description de l'expression et la localisation de la HTT et de la HTT phosphorylée à la sérine 421 dans différentes cohortes de patientes ayant développés des cancers du sein (niveaux protéiques et transcriptionnels) en collaboration avec des médecins chercheurs de l'Institut Curie et du Centre Léon Bérard (Lyon) ;
- (2) Analyse du rôle régulateur de la HTT et de la S421-P-HTT dans les processus d'adhésion, de migration et d'invasion en utilisant des lignées mammaires cancéreuses murines et humaines ;
- (3) Caractérisation de la progression carcinomateuse des souris qui présentent une absence de S421 phosphorylable ou une phosphorylation constitutive à la S421 en utilisant un modèle de carcinogenèse mammaire chez la souris ;
- (4) Etude des mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent les phénotypes observés notamment au niveau de l'adhésion intercellulaire.

Étude 2 : “ Non pathological extended CAG *huntingtin* alleles increase breast cancer risk ”

Morgane S. Thion, Sophie Tézenas du Montcel, Sophie Vacher, Laure Barjhoux, Valérie Sornin, Ivan Bièche, Olga Sinilnikova and Dominique Stoppa-Lyonnet for GEMO, Alexandra Durr and Sandrine Humbert
En préparation

En collaboration avec des médecins chercheurs de la Pitié Salpêtrière et de l’Institut Curie, nous avons analysé les associations entre la longueur de la répétition CAG polymorphique présente dans le gène codant la HTT sauvage avec les risques et le devenir de cancers (Article 2 des résultats). Deux cohortes ont été étudiées. La première cohorte regroupait des femmes porteuses de mutations *BRCA1/2* et a permis d’analyser l’effet de la répétition CAG non pathologique (en ce qui concerne la MH) sur les risques de cancer parmi des femmes porteuses d’une mutation qui les prédisposent à des cancers. Pour les porteuses de mutations *BRCA1/2* ayant développé un cancer du sein et/ou de l’ovaire, l’âge de diagnostic a également été pris en compte. La seconde cohorte regroupait une population de 431 patientes atteintes d’un cancer apparemment d’origine sporadique ; nous avons étudié les liens entre la longueur de répétitions CAG et les données clinicopathologiques disponibles. Enfin, nous avons évalué l’influence éventuelle de la longueur de la répétition sur la survie sans métastase de ces patientes.

En parallèle à ces études, j’ai eu l’opportunité de participer à deux projets en collaboration avec un thésard et un post-doctorant de l’équipe (voir Annexes, Article 3 et 4):

Étude 3 : “ The Huntington disease protein accelerates breast tumour development and metastasis through ErbB2/HER2 signalling ”

Cristovao Moreira Sousa, John Russel McGuire, Morgane S. Thion, David Gentien, Pierre de la Grange, Sophie Tézenas du Montcel, Sophie Vacher, Anne Vincent-Salomon, Alexandra Durr and Sandrine Humbert
EMBO Molecular Medicine, 2013, 5(2) :309-25

Nous avons analysé les effets de la HTT-m dans les phénomènes d’adhésion, de migration et d’invasion sur différentes lignées cellulaires ainsi que la progression tumorale dans des modèles murins de la MH et du cancer du sein, pour finir par décrire un des mécanismes moléculaires sous-jacents aux phénotypes observés.

Étude 4 : “ Huntingtin regulates mammary stem cell division and differentiation ”

Salah Elias, Morgane S. Thion, Hua Yu, Cristovao Marques Sousa, Charlene Lasgi, Xavier Morin, and Sandrine Humbert

Stem Cell Reports, 2014, Vol. 2:491-506

Nous nous sommes concentrés sur le rôle de la HTT au cours du développement de la glande mammaire. Pour cela, des modèles de souris présentant une déplétion conditionnelle de la HTT dans la glande mammaire ont été générées. L'expression de la HTT a été spécifiquement diminuée dans les cellules mammaires basales. Nous avons caractérisé les populations mammaires présentes chez ces souris (capacité clonogénique, état de différenciation). Les mécanismes moléculaires impliqués dans le rôle de la HTT au cours de la division et de la différenciation des cellules mammaires ont été étudiés dans la lignée cellulaire MCF10, lignée mammaire normale.

RÉSULTATS

Article 1. La HTT et sa phosphorylation à la S421 dans le cancer du sein

“ Loss of huntingtin promotes breast cancer metastasis by altering tight junctions ”

Morgane S. Thion, John Russel McGuire, Cristovao Marques Sousa, Julien Fitamant, Sophie Leboucher, Laetitia Fuhrmann, Sophie Vacher, Sophie Tézenas du Montcel, Ivan Bièche, Agnès Bernet, Patrick Mehlen, Anne Vincent-Salomon, and Sandrine Humbert

Au cours de cette première étude, notre objectif était d'étudier l'implication de la forme sauvage de la HTT dans les cancers du sein. Dans un premier temps, nous avons décrit l'expression transcriptionnelle mais aussi protéique de la HTT ainsi que sa localisation subcellulaire dans plusieurs cohortes de femmes atteintes de cancer du sein. Nous avons aussi analysé l'expression et la localisation de sa phosphorylation à la sérine 421, décrite comme impliquée dans des processus majeurs pour le cancer : l'apoptose et la survie cellulaire. Par la suite, nous avons réalisé des analyses fonctionnelles en diminuant l'expression de la HTT ou encore en exprimant des formes modifiées qui miment une perte de phosphorylation ou une phosphorylation constitutive, dans des modèles murins dans le but d'étudier la progression tumorale et métastatique. Des études *in vitro* nous ont permis de caractériser les phénotypes d'adhésion, d'invasion et de migration en utilisant des lignées mammaires cancéreuses murines et humaines. Finalement, nous avons décrit un des mécanismes cellulaires sous-jacent aux phénotypes observés.

Nous avons analysé l'expression de la HTT dans les cancers du sein humains. L'expression transcriptionnelle de la HTT a été évaluée par RTqPCR (quantitative reverse transcriptase PCR) dans 454 cancers du sein infiltrants (cohorte A). L'expression transcriptionnelle de la HTT est positivement corrélée à l'âge au moment du diagnostic, à l'expression des RO et des RP et est diminuée dans les carcinomes de haut grade (en comparaison des carcinomes de bas grade). L'expression de la HTT est systématiquement plus importante dans les cancers de types luminal en comparaison des cancers de type HER2 et basal. Dans une seconde cohorte de patientes (cohorte B), nous avons pu corréler l'expression transcriptionnelle à l'expression protéique de la HTT en analysant des TMA (Tissue Microarray). Comme dans la cohorte A, l'expression de la HTT est moindre dans les cancers de hauts grades en comparaison des cancers de grades I/II et dans les carcinomes de type basal en comparaison des carcinomes de types luminal et HER2. Ces résultats ont été confirmés dans la même population en utilisant un autre anticorps anti-HTT et dans une autre cohorte de 454 patientes (cohorte C). Nous avons de même évalué la présence de l'expression de la S421-P-HTT dans les

mêmes carcinomes de la cohorte B. Les sous-types moléculaires de type luminal sont plus nombreux à exprimer la S421-P-HTT, en comparaison du sous-type HER2 qui, eux-mêmes, sont plus nombreux à exprimer la S421-P-HTT que ceux du sous-type basal. Contrairement à la HTT qui présente un marquage diffus, la S421-P-HTT se localise aux niveaux des microlumières et des jonctions intercellulaires. Ainsi, la HTT est diminuée dans les carcinomes peu différenciés, à la fois au niveau transcriptionnel mais aussi protéique.

Par la suite, nous avons analysé l'expression protéique de la HTT dans trois composantes différentes pour chaque biopsie: tissu sain, carcinome canalaire *in situ* et sa composante infiltrante (cohorte D, n=44). La HTT totale présente un marquage cytoplasmique et parfois membranaire au niveau du tissu sain mais aussi au niveau du tissu cancéreux. Une analyse semi-quantitative de l'expression de la HTT a permis de mettre en valeur une augmentation de l'expression de la HTT dans les carcinomes *in situ* en comparaison des carcinomes infiltrants. Cependant, dans les cellules invasives et microinvasives, nous avons observé une forte diminution de l'expression de la HTT et de sa présence aux membranes. Dans les tissus sains, la forme phosphorylée de la HTT est très spécifiquement localisée aux jonctions intercellulaires au niveau apical des glandes mammaires saines. Dans les tissus tumoraux, la S421-P-HTT est localisée aux jonctions entre cellules et en bordure des microlumières. Contrairement à la forme totale de la HTT qui est augmentée dans les carcinomes *in situ* en comparaison des tissus sains et aux carcinomes infiltrants, on observe une diminution du nombre de carcinomes exprimant la S421-P-HTT dans les tissus tumoraux. Cette diminution est d'autant plus importante dans les carcinomes *in situ* en comparaison aux cellules infiltrantes et microinfiltrantes. Ainsi, l'expression de la HTT et de la S421-P-HTT sont particulièrement diminuées dans les cellules infiltrantes et microinfiltrantes des carcinomes mammaires.

Enfin, au vu des diminutions observées dans les carcinomes peu différenciés qui sont associés au développement de métastases, nous avons analysé l'expression transcriptionnelle de la HTT dans une autre cohorte de 60 individus qui présentaient un carcinome mammaire infiltrant (cohorte D) en fonction du statut métastatique des tumeurs. Les niveaux de transcrits de *HTT* sont significativement réduits au sein des tumeurs primaires des individus qui ont développé des métastases en comparaison des tumeurs primaires des individus sans métastases ou sans ganglions lymphatiques envahis au premier examen. Dans la cohorte A, nous avons étudié le lien entre la survie (temps depuis la chirurgie sans métastases) et l'expression de la *HTT*. Nous avons observé qu'une faible expression de *HTT* est de mauvais pronostic. De plus, en utilisant des modèles à risques proportionnels de Cox univariés, un faible taux d'expression de *HTT* est prédictif de l'apparition de métastases. Ainsi, l'expression de la HTT est moindre dans les tumeurs humaines métastatiques et la sous-expression de la HTT est de mauvais pronostic.

Au vu de la diminution d'expression de *HTT* dans les cancers métastatiques et de mauvais pronostics, nous nous sommes demandé si la *HTT* elle-même jouerait un rôle dans les processus de migration et d'invasion. Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé des cellules 4T1, des cellules murines métastatiques. Lorsque les niveaux d'expression de *HTT* sont réduits dans ces cellules, leur capacité de motilité (migration aléatoire, fermeture de blessure) et d'invasion (chambre de Boyden avec matrigel) est augmentée, alors que l'adhésion cellule-cellule est diminuée dans des cellules confluentes.

Pour étudier le rôle de la *HTT* *in vivo*, des cellules 4T1-luciférase ont été injectées dans la veine de la queue de souris syngéniques, les BALB/c (Rusty Mc Guire, Julien Fitamant, Lyon, CRCL). Dans ce modèle les cellules 4T1 conduisent à l'apparition de métastases pulmonaires. Chez les souris traitées avec un siRNA dirigé contre la *HTT*, nous avons observé une augmentation significative des métastases. Afin d'étudier l'implication de la phosphorylation de la *HTT* dans la progression tumorale *in vivo*, nous avons utilisé un modèle de souris knock-in pour la *S421* disponibles au laboratoire : la *S421* a été remplacée soit par une alanine qui n'est pas phosphorylable (*Hdh*^{*S421A/S421A*}), soit par un acide aspartique, pour mimer une phosphorylation constitutive (*Hdh*^{*S421D/S421D*}). Nous avons croisé ces souris avec un modèle de carcinogenèse mammaire, les souris MMTV-PyVT qui expriment un oncogène actif (le virus du polyome antigène moyen T, PyVT) dans les cellules épithéliales (Guy et al., 1992). Les souris MMTV-PyVT/*Hdh*^{*S421A/S421A*} développent plus de tumeurs, de tailles plus importantes et qui sont plus prolifératives que les tumeurs MMTV-PyVT/*Hdh*^{*S421D/S421D*} et sauvages. Lorsque les cellules des tumeurs sont mises en culture, les cellules primaires MMTV-PyVT/*Hdh*^{*S421A/S421A*} ont des capacités de migration et de résistance à l'anoïkis plus importantes que les souris contrôles ou les MMTV-PyVT/*Hdh*^{*S421D/S421D*}.

Nous avons observé que la *S421*-P-*HTT* est localisée au niveau des microlumières et des zones de contacts intercellulaires dans les carcinomes mammaires humains. Nous avons utilisé la lignée tumorale mammaire humaine, les cellules MCF7, qui présentent une forte expression de *HTT*. Dans cette lignée, une diminution de la *HTT* par approche siARN ou shARN, entraîne spécifiquement une diminution marquée de ZO1 sans modification majeure des autres protéines présentes aux jonctions adhérentes telles que la E-cadherine et la β -caténine, observées à la fois en Western Blot et après immunofluorescence. Nous avons aussi observé une relocalisation de ZO1 de la membrane plasmique au cytoplasme cellulaire. Cependant, diminuer l'expression de ZO1 n'altère pas les niveaux d'expression de la *HTT*. D'autre part, nous avons analysé l'expression et la localisation de ZO1 dans les tumeurs murines modifiées pour la phosphorylation à la *S421* de la *HTT*. Les tumeurs MMTV-PyVT/*Hdh*^{*S421A/S421A*} présentent une diminution de l'expression et de la localisation de ZO1 aux jonctions intercellulaires en comparaison des tumeurs contrôles ou MMTV-PyVT/*Hdh*^{*S421D/S421D*} sans modification majeure de la localisation de β -caténine aux jonctions membranaires. Dans les MCF7, la *S421*-P-*HTT* est présente dans le cytoplasme et le noyau cellulaire, mais s'accumule aux niveaux des

jonctions intercellulaires où elle colocalise avec ZO1, en bon accord avec sa localisation dans les tissus humains. Dans ces cellules, la HTT et ZO1 font partie d'un même complexe révélé par des expériences de co-immunoprécipitation. Ainsi, la HTT fait partie d'un complexe avec ZO1 et la perte de HTT altère l'adhésion intercellulaire en modulant la localisation de ZO1 à la membrane.

Enfin, nous nous sommes demandé si les modifications d'expression de la HTT dans les carcinomes humains étaient associées à une modulation de l'expression de ZO1 (cohorte C). L'expression transcriptionnelle de *ZO1* est moindre dans les 15 échantillons qui présentent une faible expression de *HTT* par comparaison avec les 15 échantillons présentant une forte expression de *HTT*, indépendamment des sous-types moléculaires, alors que ce n'est pas le cas pour d'autres marqueurs des jonctions serrées, tels que l'occludine, les claudines 1 et 4. L'expression de *ZO1* et celle de *HTT* sont positivement corrélées dans ces 30 échantillons. De plus, nous avons étudié l'expression protéique de ZO1 dans 132 carcinomes mammaires. Comme décrit dans la littérature, nous avons observé que le marquage membranaire de ZO1 diminue avec le grade histopronostique. Ce marquage membranaire est plus important dans les carcinomes de sous-type luminal A en comparaison des HER2 et aux basal et suit les mêmes modulations d'expression que la HTT. De façon très intéressante, la présence nucléaire de ZO1 augmente avec le grade histopronostique et est majoritairement observée dans le sous-type basal en comparaison du sous-type luminal et des HER2, sous-type présentant les plus faibles taux d'expression de HTT. Dans 11 cas de cancers pour lesquels nous avons une composante *in situ*, nous avons observé une localisation similaire de ZO1 et de la forme phosphorylée de la HTT à la sérine 421. Cette colocalisation était absente dans les cellules infiltrantes adjacentes à la composante *in situ*. Ces résultats suggèrent que l'expression de la HTT et de ZO1 sont co-régulés dans les cancers du sein humains.

En conclusion, ces études ont mis en valeur un rôle important de la HTT et de sa phosphorylation à la S421 dans le cancer du sein et plus particulièrement au cours du processus métastatique. Ces travaux participent à la description du rôle de la HTT dans l'adhésion intercellulaire dans un nouveau contexte au sein des cellules épithéliales mammaires, et conduisent à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de métastases.

Loss of huntingtin in breast cancer promotes metastasis by altering tight junctions

Morgane Sonia Thion^{1,2,3,4}, John R. McGuire^{1,2,3}, Cristovao M. Sousa^{1,2,3}, Julien Fitamant⁵, Sophie Le Boucher^{1,2,3}, Laetitia Fuhrmann¹, Sophie Vacher¹, Sophie Tezenas du Montcel^{6,7,8}, Ivan Bièche^{1,9}, Agnès Bernet⁵, Patrick Mehlen⁵, Anne Vincent-Salomon^{1,10}, and Sandrine Humbert^{1,2,3,*}

¹Institut Curie, Paris, France

²CNRS UMR 3306, Orsay, France

³INSERM U1005, Orsay, France

⁴University Paris Sud 11, Orsay, France

⁵Apoptosis, Cancer and Development *Laboratory*, Equipe labellisée 'La Ligue', Centre National de la Recherche Scientifique UMR5238, Université de Lyon, Lyon, France.

⁶Department of Biostatistics and Medical Informatics, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris

⁷Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, F-75013, Paris, France

⁸INSERM, UMR_S 1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, F-75013, Paris, France

⁹University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France

¹⁰Department of Pathology, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris, France.

*To whom correspondence should be addressed: sandrine.humbert@curie.fr

SUMMARY

The mechanisms underlying the dissemination of cancer cells are a matter of intense research as metastasis is the most frequent cause of cancer death. Here we show that the levels of huntingtin (HTT), the protein mutated in Huntington's disease, and of its serine 421-phosphorylated form are decreased in poorly differentiated and metastatic human breast cancers. In mouse, silencing of HTT promotes lung colonization of a metastatic mammary cancer cell line and S421-unphosphorylatable-HTT accelerates cancer progression. In fact, HTT interacts with ZO1, regulates its expression and its localization to tight junctions. In human breast tumors, HTT and ZO1 expression follow a similar pattern of expression. Thus, HTT is an inhibitor of breast tumor dissemination through the maintenance of ZO1 to tight junctions.

INTRODUCTION

Metastasis is the leading cause of breast cancer death. It is a complex process by which a tumor cell escapes from the primary tumor to enter the circulatory system, travel to another distant tissue where it results in the development of a secondary tumor. Breast cancer metastases can remain latent for several years following primary tumor removal and over 30 percent of women with breast cancer will develop metastases months or even years after their diagnosis. While the classification of breast tumors into distinct molecular subtypes has permitted the development of efficient targeted treatments for a majority of primary tumors, therapies have still limited effects on metastasis. Therefore predicting the risk of metastasis occurrence and limiting their progression are therapeutic challenges. To be reached, such goals will inevitably be based on a sound understanding of the molecular mechanisms underlying this multistep process.

One of the key step during tumorigenesis and metastasis is the modification of cellular adhesion, that is ensured in normal conditions by three junctional complexes: desmosomes, adherens junctions and tight junctions (reviewed in (Itoh and Bissell 2003; Knights et al. 2012; Martin and Jiang 2009; Runkle and Mu 2013)). Tight junctions are the most apically localized. These macromolecular complexes contain integral membrane proteins constituting the core of the junctions and associated cytoplasmic proteins that can link the membrane components to the actin cytoskeleton. Signaling molecules involved in the regulation of the integrity of tight junctions have also been described as part of the complexes. Tight junctions were historically studied for their functions as a barrier regulating the permeability between adjacent cells and as intramembranous diffusion fence restricting the diffusion of lipids and proteins of apical and basolateral domains. However, there is evidence for a role of tight junctions in cell proliferation, differentiation and metastasis suppression. In fact, several transmembrane components and adaptor proteins show changes in expression in a wide range of cancer types. In particular, the expression of the zona occludens protein 1 ZO1 is down-regulated in human breast carcinoma as compared to healthy tissue (Hoover et al. 1998; Martin et al. 2004; Tokes et al. 2012). Low levels of ZO1 are associated with loss of glandular differentiation and poor patient prognosis.

Huntingtin (HTT) is the protein mutated in Huntington's disease, a dominant inherited neurological disorder that manifests during adulthood. For obvious reasons, most of the studies have thus focused on the roles of the wild-type and mutant HTT in the nervous system. However, HTT expression is ubiquitous (Moreira Sousa and Humbert 2013). As expected, it is abundant in several regions of the brain and various cell types in the central nervous system. Epithelial cells in several peripheral tissues -including the mammary gland- have also high levels of HTT (Elias et al. 2014; Moreira Sousa and Humbert 2013). Furthermore, while the protein has central cellular functions in regulating transcription and intracellular transport that are definitely important beyond the nervous system (Caviston et al. 2007; Zuccato et al. 2003) (Gauthier et al. 2004; Moreira Sousa and Humbert 2013), there have been few investigations of the physiological relevance of HTT in peripheral tissues.

In zebrafish, HTT knock-down produces symptoms of cellular iron deficiency (Lumsden et al. 2007). In agreement, an earlier study in mouse described a phenotype consistent with a defect in iron transport in extraembryonic tissues lacking HTT (Dragatsis et al. 1998). Wild-type HTT has also been reported to be required for spermatogenesis: reduced HTT expression in testis results in disorganized seminiferous tubules with fewer spermatocytes and round spermatids (Dragatsis et al. 2000). More recently, we showed that wild-type HTT is essential for mammary morphogenesis. HTT regulates the mitotic spindle orientation and the differentiation of mammary progenitors (Elias et al. 2014).

Mutant HTT is expressed in human breast tumors from HD patients where it influences cancer progression (Moreira Sousa et al. 2013). Mutant HTT accelerates epithelial to mesenchymal transition and enhances cell motility and invasion. Also, oncogene-induced mammary tumors develop faster and lung metastasis is higher in HD conditions than in control mice. There is no data available on the function of wild-type HTT during breast cancer progression. Here we show that HTT levels are decreased in poorly differentiated and metastatic human breast cancer. Together, our data support a role for HTT in regulating tumor differentiation status and dissemination through the maintenance of tight junctions.

RESULTS

HTT Expression is Down-regulated in Poorly Differentiated Human Breast Cancers

We investigated HTT expression in human breast cancer. *HTT* transcripts were analyzed by quantitative real time PCR (qRT-PCR) in 449 invasive human breast cancers (cohort A). We analyzed the correlation between *HTT* expression and the general clinicopathological parameters in this cohort (Table S1). *HTT* transcript levels were positively correlated with age of cancer diagnosis ($p=0.001$) and were decreased with advanced histopathological grading (grade III, $p<0.0001$). Furthermore, there was a positive correlation between *HTT* expression and estrogen receptor (ER) ($p<0.0001$) and progesterone receptor (PR) positive status ($p<0.0001$) even though there was no relation between *HTT* transcript and HER2 status ($p=0.08$). *HTT* was statistically significantly differentially expressed in the four molecular subgroups considered: luminal (HR+, HER2-), luminal B/HER2+ (HR+, HER2+), HER2+ (HR-, HER2+), and triple-negative (TPN) (HR-, HER2-). *HTT* expression levels were highest in luminal and luminal B/HER2+ as compared to HER2+-enriched subtype, itself expressing higher levels than in the TPN subtype ($p<0.0001$).

We next examined *HTT* transcript expression by qRT-PCR and, HTT protein expression by semi-quantitative analysis of a tissue microarray (TMA)-based immunohistochemical study in invasive human breast tumors (Figures 1A to 1D and Table S3; cohort B). As in cohort A, *HTT* transcript expression was lower in grade III as compared to grade I/II tumors (mean log *HTT* mRNA relative expression (grade I/II)=-0.30, $n=23$; mean log *HTT* mRNA relative expression (grade III)=-0.57, $n=94$; t-test, $p=0.0055$). It was also significantly higher in luminal tumors, than in HER2+ tumors, itself higher than in triple-negative tumors (Figure 1A). HTT protein levels followed the same pattern of expression than that of *HTT* transcripts regarding histopathological grading (mean HTT H score (grade I/II)=272.7, $n=30$; mean HTT H score (grade III)=194.4, $n=102$; Mann-Whitney test, $p<0.0001$) and molecular subtypes (Figures 1C and 1D). Indeed, HTT transcript and protein levels were positively correlated for the 111 patients for whom we had access to both the transcript and protein expression levels ($p<0.0001$; correlation coefficient=0.518) (Figure 1B). We confirmed the TMA results in the same cohort using another anti-HTT antibody targeting a different region (Figure S1). We analyzed HTT protein expression in another cohort of 454 invasive breast carcinomas (cohort C) and found similar results (Tables S2 and S3).

We also performed immunohistochemical staining for the presence of HTT phosphorylated at serine 421 (S421-P-HTT), a modification known to regulate HTT toxicity and function (Colin et al. 2008; Humbert et al. 2002; Pardo et al. 2006) (Figures 1E and 1F; cohort B). Interestingly, while total HTT displayed marked diffuse cytoplasmic staining (Figure 1D), S421-P-HTT staining specifically localized to cell-cell contacts near microlumens (Figure 1E). S421-P-HTT followed the same overall pattern of expression than that of total HTT with the highest expression found in the luminal subtype (Figure 1F).

We conclude that HTT is down-regulated in poorly differentiated subtypes of human breast cancer at the transcriptional and protein levels.

HTT Expression is Down-regulated in Micro-invasive and Invasive Human Cells

We further investigated HTT expression in human breast tumor as well as in healthy tissue. Immunohistochemical studies using an anti-HTT antibody were performed in 115 invasive ductal carcinomas (IDC; selected from cohort C) and 44 micro-invasive ductal carcinomas (MIDC from cohort D, Table S3) (Figures 2A and 2B). We had access to three different structures from the same biopsies for each patient: healthy mammary gland, *in situ* carcinoma and micro-invasive or invasive cells. HTT was mainly found in the cytoplasm (Figures 2A and 2B) but we also observed an intense membrane staining in some cases. Semi-quantitative analysis of cytoplasmic HTT showed higher levels of HTT in *in situ* tumors as compared to healthy tissue from the same biopsies (Figures 2C and 2D). In invasive and micro-invasive, there was a significant decrease of HTT in the cytoplasm as compared to *in situ* carcinomas (Figures 2A to 2D). In microinvasive ductal carcinomas, where HER2+ molecular subtype was over-represented, we found high level of HTT at the membrane as compared to healthy tissue and micro-invasive cells (Figure 2E).

We also performed immunohistochemical staining for the presence of S421-P-HTT. S421-P-HTT was localized to small punctate structures at the apical sides of the junctions between healthy breast cells (Figure 2B). As observed in cohort B (Figure 1E), S421-P-HTT was also specifically present at cell-cell junction near the lumen formation in tumoral tissues. Interestingly, the regulation of S421-P-HTT level differed from that of total HTT. S421-P-HTT was not upregulated in tumors as HTT was (Figures 2C, 2D and 2F). Instead, we observed a striking loss in the junction specific S421-P-HTT staining in micro-invasive cancer cells and to a lesser degree in *in situ* tumors as compared to healthy tissue (Figure 2F).

Thus, HTT levels are down-regulated in invasive and micro-invasive cells. Specifically, the localization of HTT at the membrane and that of S421-P-HTT at cell junctions are lost in microinvasive cells.

HTT Expression is Down-regulated in Metastatic Human Breast Cancers

Metastasis is related to a poor differentiation and to specific molecular subtypes of cancer in which we found HTT levels down-regulated. We thus analyzed HTT mRNA expression in primary tumors of a panel of 69 patients without regional lymph node or distant metastasis (N0-M0, n=15), or with regional lymph node metastasis but not distant metastasis (N1-M0, n=40), or with distant metastasis (M1, n= 14) (cohort E). *HTT* was significantly less expressed in M1 primary tumor as compared to N0-M0 and N1-M0 tumors (Figure 3A).

Moreover, Kaplan-Meier metastasis-free survival (MFS) curves showed that patients with low HTT transcript levels ($n=58$, <0.88) developed metastasis significantly faster as compared to others ($n=398$, ≥ 0.88) (Figure 3B; cohort A, $p=0.001$). Besides, *HTT* mRNA expression was also associated with MFS (HR 0.66; 95% CI 0.46-0.95; $p=0.02$; Figure 3C) as analyzed by univariate Cox proportional hazards model. Collectively, these results showed that HTT expression is lowered in aggressive, poor prognosis and metastatic human breast tumors independently of the molecular subtypes.

HTT Regulates Breast Cancer Cell Motility *in vitro* and Metastasis *in vivo*

Because HTT is down-regulated in metastatic human breast cancer as well as in microinvasive and invasive human breast cancer cells, we wondered if HTT itself play a role in cell adhesion, motility and invasion. We transfected 4T1 metastatic murine breast cancer cells with a control siRNA (si-control) and a siRNA targeting HTT (si-HTT1). The efficiency of si-HTT1 at decreasing endogenous HTT levels in 4T1 cells was confirmed by immunoblotting (Figure 4A). HTT-depleted cells showed a marked decrease of the tight junction protein, ZO1 and to a lesser extend of epithelial cell-cell adhesion proteins, E-cadherin and β -catenin. Individual and collective cell movements were then assessed using random migration and scratch closure assays respectively. In these assays, cells expressing si-HTT1 moved about 50% faster than the control si-RNA expressing cells (Figures 4B and 4D). We also reduced HTT levels using si-HTT2 and an shRNA (sh-HTT), whose target sequences in HTT are different to that of si-HTT1. Again, decreasing HTT levels resulted in an increase velocity as compared to controls (Figures 4B and 4C). Next, we introduced a construct encoding a full-length HTT (Figures 4C; FL HTT)(Pardo et al. 2010). sh-HTT was designed to inhibit the expression of endogenous HTT but had no effect on the expression of the HTTFL construct. Expression of the full-length HTT restored the migration defect caused by sh-HTT to the control situation (Figure 4C). We also assessed the invasion capacities of 4T1 cells using Boyden chambers containing a layer of matrigel on top of the membrane (matrigel assay). Decreasing endogenous HTT levels led to an increased invasion of 4T1 cells in the matrigel (Figure 4E).

To determine the consequence of HTT down-regulation *in vivo* on metastasis, we chose an experimental paradigm in which syngenic mice are tail-vein injected with 4T1-luc cells (Fitamant et al. 2008). Metastasis to the lungs is monitored by live bioluminescence imaging following systemic injection of luciferin. In this assay, mice were injected with a si-control or a si-HTT1 siRNA. Seven days after the cancer cell injections, we found a striking ten-fold increase in the luciferase signal in the lungs of si-HTT1-treated mice as compared to si-control-treated mice (Figure 4F and G). Macroscopic evaluation of the dissected lungs indicated a higher level of metastasis in the si-HTT1-treated mice (Figure 4H). Immunofluorescence evaluation of the lungs of si-HTT1-treated mice revealed that the luciferase-positive 4T1-luc cells did indeed show a substantially decreased level of HTT as compared to control mice (Figure 4H). Thus, in the absence of HTT, metastasis is increased *in vivo*.

Absence of HTT Phosphorylation at S421 Accelerates Cancer Progression

To investigate the role of S421-P-HTT in breast cancer progression *in vivo*, we generated knock-in mice in which the codon for serine at position 421 of the gene encoding mouse HTT (*Hdh*) was replaced by a codon for alanine (*Hdh*^{S421A/S421A}) or for an aspartic acid residue (*Hdh*^{S421D/S421D}). These mice were viable with no gross anatomical abnormalities as compared to wild-type mice. More specifically, mammary glands of mice from the three genotypes had a comparable architecture as assessed by whole mount analyses (Figures S2A-S2C). We crossed these mice to a transgenic mouse model of murine mammary adenocarcinoma, the MMTV-polyoma middle T (PyVT) mouse model (Guy et al. 1992). Tumor latency was similar in MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} (PyVT/*Hdh*^{+/+}), MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} (PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} (PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}) animals (Figure 5A). However, mimicking loss of HTT phosphorylation accelerates tumor progression as compared to the control or PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} mice (Figure 5B). At 16 weeks of age, there was no difference in mice weight (Figure 5C) whereas tumor burden was increased in PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} mice as compared to PyVT/*Hdh*^{+/+} and PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} animals (Figure 5D and 5E). We analysed primary tumor sections by immunohistochemistry. Haematoxylin and eosin stainings analysis showed that PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} tumors were less differentiated than PyVT/*Hdh*^{+/+} and PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} tumors (Figure S2D). We wondered if differences in tumor growth could result from altered cell proliferation and/or apoptosis. Ki67 and cleaved-caspase 3 staining were performed on tumors sections. Whereas there was no difference in apoptosis, PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} tumors were more proliferative than control or PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} tumors (Figure 5F,5G and S2D). Thus, mimicking loss of HTT phosphorylation accelerates mammary tumor progression.

HTT Phosphorylation at S421 Regulates Cancer Cells Motility in Culture

We took advantage of S421 knock-in mice to derive primary tumor cells from MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+}, MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} tumors (respectively PyVT/*Hdh*^{+/+}, PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} and PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} cell lines) and performed random cell migration assays. Cells expressing non-phosphorylatable HTT moved faster than PyVT/*Hdh*^{+/+} and PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} cells (Figure 5H). Furthermore, we determined cell viability in suspension cultures using annexin V and propidium iodide (PI) stainings measured by flow cytometry. There were more live cells and less apoptotic and dead cells in PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} cells as compared to PyVT/*Hdh*^{+/+} and PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} cells (Figure 5I). Thus, loss of HTT phosphorylation is associated with increased migratory capacity as well as resistance to anoikis in primary tumor cell lines.

HTT forms a complex with ZO1 and is required for the localization of ZO1 at cell-cell junction

Given our different observations in mouse and in cellular assays coupled to the specific localization of S421-P-HTT in human breast tissue, we tested whether HTT could play a role at mammary cancer cell

junctions. We used MCF7 human mammary carcinoma cells of luminal phenotype which express high level of HTT. We addressed the effect of reducing HTT levels on ZO1, E-cadherin and β -catenin. In MCF7 cells treated with two si-RNA targeting human HTT (si-HTT3 and si-HTT4) or in cells stably expressing a sh-RNA against HTT (sh-HTT), we observed a marked decrease of ZO1 protein expression levels, while those of E-cadherin and β -catenin were only slightly affected as compared to the control situations (Figure 6A). In MCF7 cells with lowered HTT levels, ZO1 was mainly delocalized from the cell membrane to the cytoplasm (Figures 6B and 6C). In contrast, E-cadherin and β -catenin mostly remained at cell-cell membranes with however a slightly more diffuse staining than in controls. We also analyzed the contribution of S421 phosphorylation by labelling of PyVT/*Hdh*^{+/+}, PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} and PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} tumor sections for endogenous β -catenin and ZO1 (Figure 6D). PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} tumors showed a decreased ZO1 localization at cell-cell contact as compared to PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} and wild-type tumors. There was no marked mislocalization of β -catenin that seems however, as in cell culture, slightly more diffuse in PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} tumors as compared to PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} and wild-type tumors. We conclude that HTT regulates the localization of ZO1 at cell-cell contact and S421-P-HTT may represent an activated form of HTT at this location.

S421-P-HTT localization in human biopsies is reminiscent of that of ZO1 (Figure 1E and 2B), we thus immunostained MCF7 cells for these proteins. Immunostaining, Z-projections and the corresponding representative line scan analysis revealed S421-phosphorylated-HTT labelling in the cytoplasm, in the nucleus and also at cell-cell junctions where it colocalized with ZO1 (Figures 6E and 6F). Moreover, immunoprecipitation of HTT from MCF7 cells led to the coimmunoprecipitation of ZO1 (Figure 6G). Thus, HTT is part of a complex containing ZO1 and loss of HTT may compromise cell-cell cohesion by altering ZO1 localization at the membrane with functional consequences on cell motility, invasion and metastasis in mice.

S421-P-HTT and ZO1 Colocalize at Cell Junctions in Human Breast Cancer

We then asked whether changes in HTT expression were associated to changes in ZO1 expression in human samples. We determined *ZO1* mRNA levels in 30 samples selected from cohort A: the 15 patients with the lowest level of *HTT* and the 15 patients with the highest level of *HTT*. *ZO1* mRNA had a pattern of expression that was similar to that of *HTT* mRNA (Figure 7A). The relationship between *HTT* and *ZO1* was specific as the expression levels of *occludin*, *claudin 1* and *claudin 4*, other proteins associated with tight junctions, were not related to that of *HTT*. The expression of *ZO1* and *HTT* at the transcriptional levels were positively correlated (Figure 7B).

ZO1 protein expression was previously shown to be down-regulated in tumors as compared to healthy mammary tissues (Tokes et al. 2012). Moreover, loss of ZO1 expression was observed in poorly differentiated and metastatic tumors (Hoover et al. 1998; Martin et al. 2004). We analyzed TMA sections from selected IDC (n=132; cohort C) by immunohistochemistry. ZO1 displayed a typical staining at cell-cell contacts that was decreased with advanced histopathological grading (mean ZO1

H score (grade I)=2.18, n=22; mean ZO1 H score (grade II)=1.48, n=23; mean ZO1 H score (grade III)=1.24, n=77; Kruskal-Wallis test, $p=0.0004$). This staining was also correlated to the molecular subtypes (Figure 7C and 7D): it was higher in luminal A breast cancer, as compared to HER2+ and TPN subtypes. Interestingly, in triple-negative subtype ZO1 staining was lost at the membrane, while there was a marked labelling in the nucleus. Unlike ZO1 membrane staining, ZO1 nuclear staining was increased with advanced histopathological grading (mean H score (grade I)=0.09, n=22; mean H score (grade II)=0.34, n=23; mean H score (grade III)=0.64, n=77; Kruskal-Wallis test, $p=0.0156$).

The loss of ZO1 localization at the membrane in poorly differentiated and aggressive cancer is reminiscent of what we observed with S421-P-HTT. We thus investigated whether the two proteins colocalized in human samples. We stained serial sections of 11 IDC with *in situ* tumoral tissue and adjacent invasive cells (cohort C) with anti-S421-P-HTT and anti-ZO1 antibodies. The two proteins labelled cell-cell junctions of consecutive sections of *in situ* tumors (Figure 7E). This colocalization was lost in invasive cells (data not shown).

These results suggest that HTT and ZO1 expression are co-regulated in human breast cancer. In particular, S421-P-HTT and ZO1 colocalize at cell junctions in *in situ* tumors and this localization is lost in invasive cells.

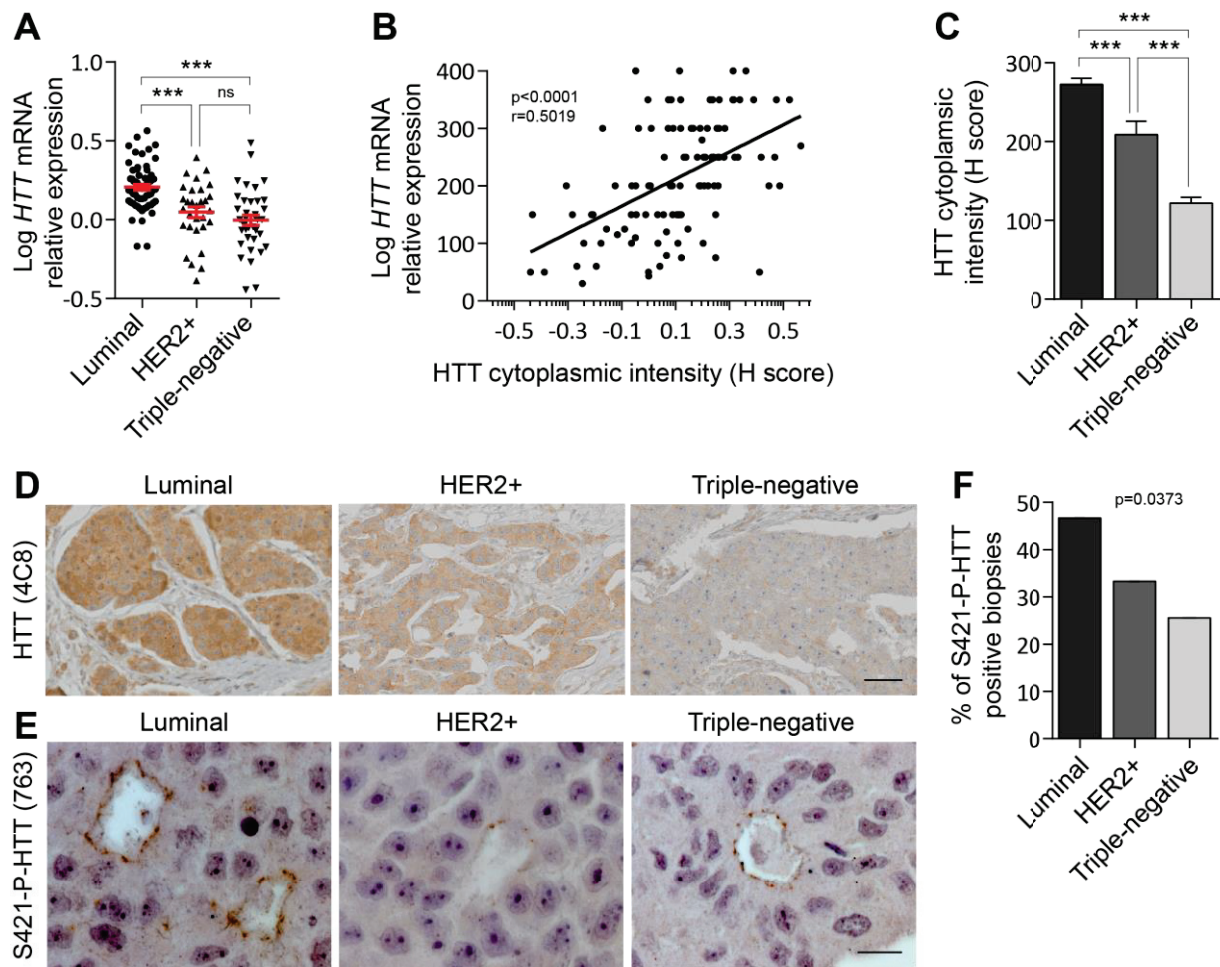


Figure 1. HTT and S421-P-HTT Expression are Down-regulated in Poorly Differentiated Human Breast Cancers

(A) Log *HTT* mRNA relative expression in luminal (n=69), HER2-enriched (n=30), and basal-like (n=37) human breast tumors (cohort B).

(B) Correlation curve between HTT cytoplasmic intensity (H score) and log *HTT* mRNA relative expression (cohort B; n=111).

(C) Semi-quantitative analysis of HTT protein levels luminal (n=62), HER2-enriched (n=31) and triple-negative (n=44) human breast tumors (cohort B).

(D, E) Representative staining of total HTT (4C8) (D) and S421-P-HTT (763) (E) in luminal, HER2-enriched and triple-negative human breast tumors (cohort B). Scale bar HTT, 60μm; scale bar S421-P-HTT, 20μm.

(F) % of S421-P-HTT positive tumors in luminal (n=55), HER2-enriched (n=27) and triple-negative (n=47) human breast tumors (cohort C).

See also Figure S1. Data are mean \pm SEM. *** $p<0.001$; ns, not significant.

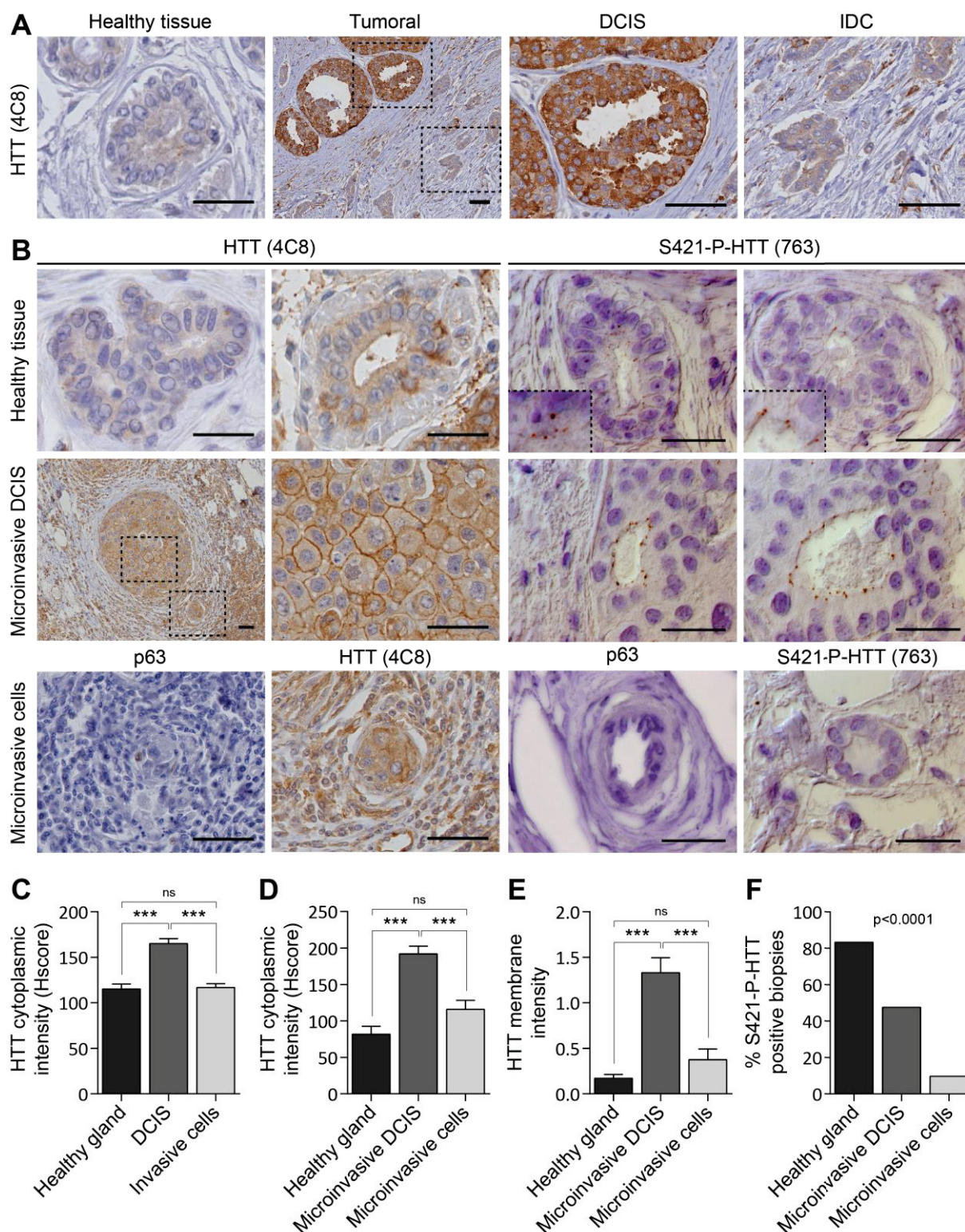


Figure 2. HTT and S421-P-HTT Expression are Down-regulated in Invasive and Microinvasive Cancer Cells

(A) Representative staining of total HTT (4C8) in residual healthy tissue, in *in situ* carcinoma and invasive cells of (cohort C; n=115).

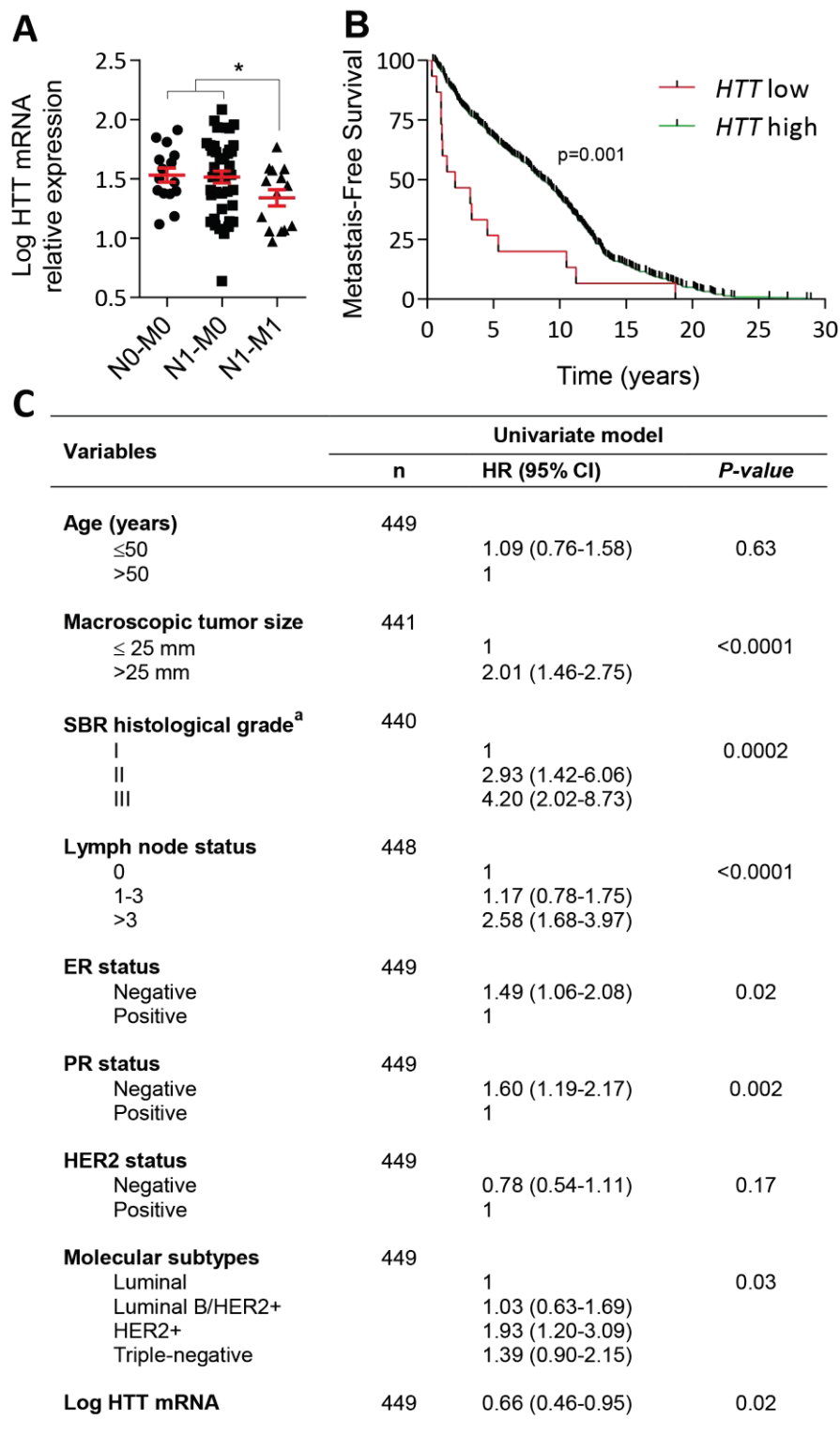
(B) Representative staining of total HTT (4C8) and S421-P-HTT staining (763) in residual healthy tissue, *in situ* carcinoma and microinvasive cells from the same biopsy sample with p63 staining to confirm the status of microinvasive cells (cohort D).

(C) Semi-quantitative analysis of HTT expression levels in residual healthy tissue, *in situ* carcinoma and invasive cells (H score; cohort C; n=115).

(D, E) Semi-quantitative analysis of HTT expression levels in the cytoplasm (D) and at the membrane (E) in residual healthy tissue, *in situ* carcinoma and microinvasive cells (cohort D; n=44).

(F) Percentage of S421-P-HTT positive tumors in residual healthy tissue, *in situ* carcinoma and microinvasive cells (cohort D; n=44).

Scale bars, 50 μ m. Data are mean \pm SEM. ***p<0.001; ns, not significant.



^a Scarff Bloom Richardson classification.

Figure 3. HTT Down-regulation Predicts Metastasis Development

(A) Log *HTT* mRNA relative expression levels in patients with breast carcinomas without axillary lymph node or distant metastasis (N0-M0, n=15) or with axillary lymph node metastasis without distant metastasis (N1-M0, n=40) or with both (M1, n=14)(cohort E). Data are mean +/- SEM. * $p<0.05$.

(B) Kaplan Meyer metastasis free survival curves of patients expressing low levels of *HTT* (n=15) as compared to patients expressing high levels of *HTT* (n=439)(cohort A).

(C) Univariate Cox proportional hazard models for predicting MFS (cohort A; n=449). HR, Hazard ratio; CI, Confidence interval.

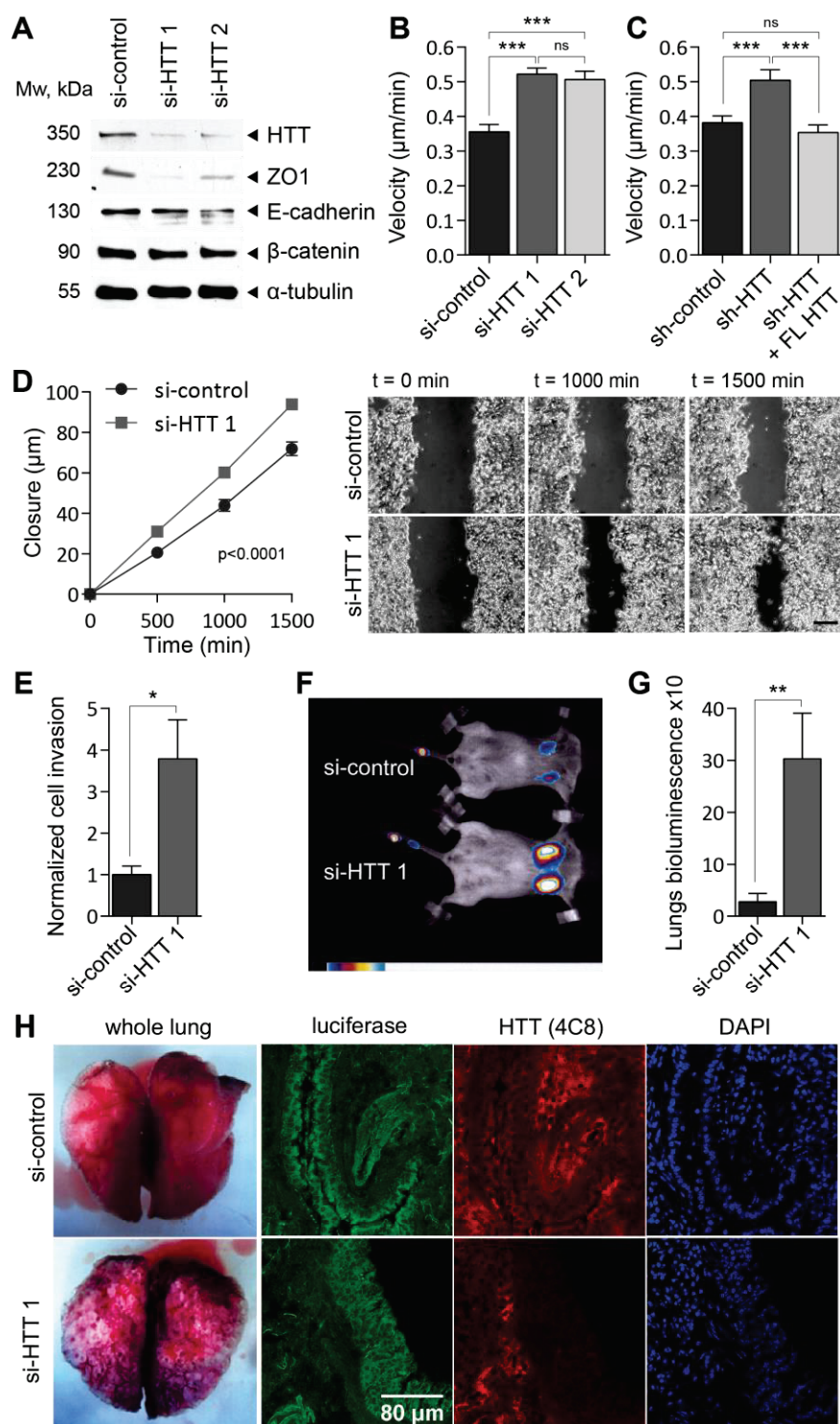


Figure 4. HTT Regulates Cell Motility *in vitro* and Metastasis *in vivo*

(A) Immunoblotting analysis of 4T1 cells treated with si-control or si-HTT1 or si-HTT2.

(B, C) Random migration assays for 4T1 cells treated with si-control or si-HTT1 and si-HTT2 (B) and for 4T1 cells treated with sh-luc- and sh-HTT shRNA with or without a plasmid encoding full-length HTT (FL HTT) (C).

(D) Scratch closure assays for 4T1 cells treated with si-control or si-HTT1. Scale bar, 100 μm.

(E) Matrigel invasion assay for 4T1 cells treated with si-control or si-HTT1.

(F) Bioluminescence images of BALB/C mice injected with 4T1 luciferase cells and treated seven days with si-control or si-HTT1 (n=11 mice per group).

(G) Quantification of the lung luciferase signal of metastasized 4T1 cells of both groups of mice at day 7 of treatment.

(H) The four columns show (from left to right) whole lungs dissected from mice at the time of death from si-control and si-HTT1 treated mice, luciferase, total HTT (4C8), and DAPI staining.

Data are mean ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001; ns, not significant.

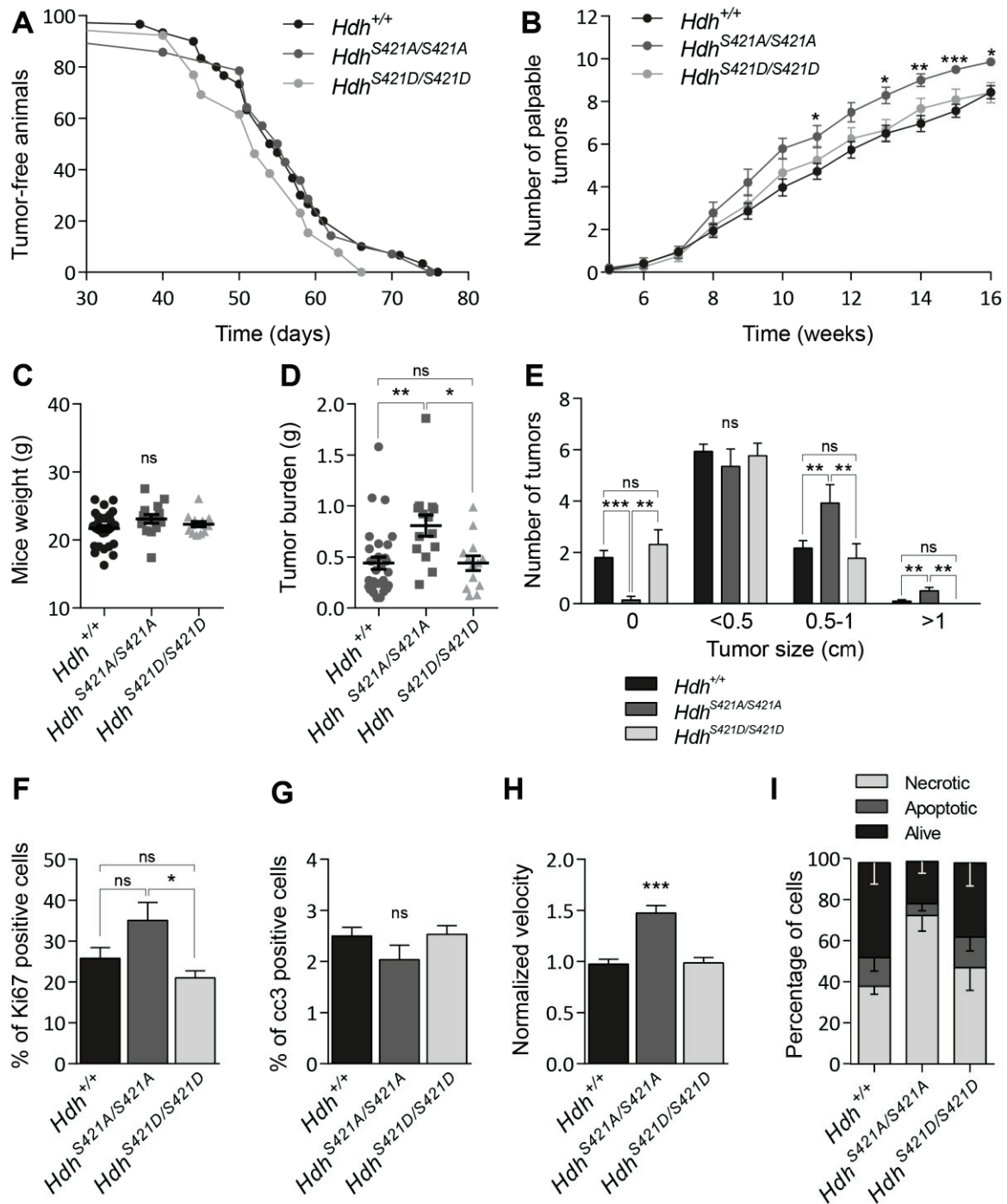


Figure 5. Absence of S421 Phosphorylation at S421 Accelerates Cancer Progression

(A) Tumor-free survival curves of MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} (*Hdh*^{+/+}, t_{50} =54.5 days; n=30), MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} (*Hdh*^{S421A/S421A}, t_{50} =55.5 days; n=12) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} (*Hdh*^{S421D/S421D}, t_{50} =52 days; n=13) mice. Kaplan-Meier analysis, Logrank test: ns. (B) Number of glands positive for palpable tumors per animal from 5 to 16 weeks in 30 MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+}, 14 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} and 12 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} mice.

(C, D, E) MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} (n=30), MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} (n=14) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} (n=13) mice weight (C), total tumor burden (D) and tumor size designated as small (<0.5cm), medium (0.5 to 1.0 cm), and large (>1.0 cm in diameter) (E) at 16 weeks.

(F) The graphs represent the quantitative analysis of the percentage of Ki67 positive cells (three tumors per genotype, at least 7183 cells scored per condition).

(G) The graphs represent the quantitative analysis of the percentage of cleaved caspase-3 positive cells (three tumors per genotype, at least 4672 cells scored per condition).

(H) Random migration for MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} (*Hdh*^{+/+}), MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} (*Hdh*^{S421A/S421A}) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} (*Hdh*^{S421D/S421D}) cells.

(I) Cells were cultured in suspension, stained for annexin V and propidium iodide, and analysed by a flow cytometry analysis. Live, apoptotic and dead cell populations are quantified.

See also Figure S2. Data are mean \pm SEM. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; ns, not significant.

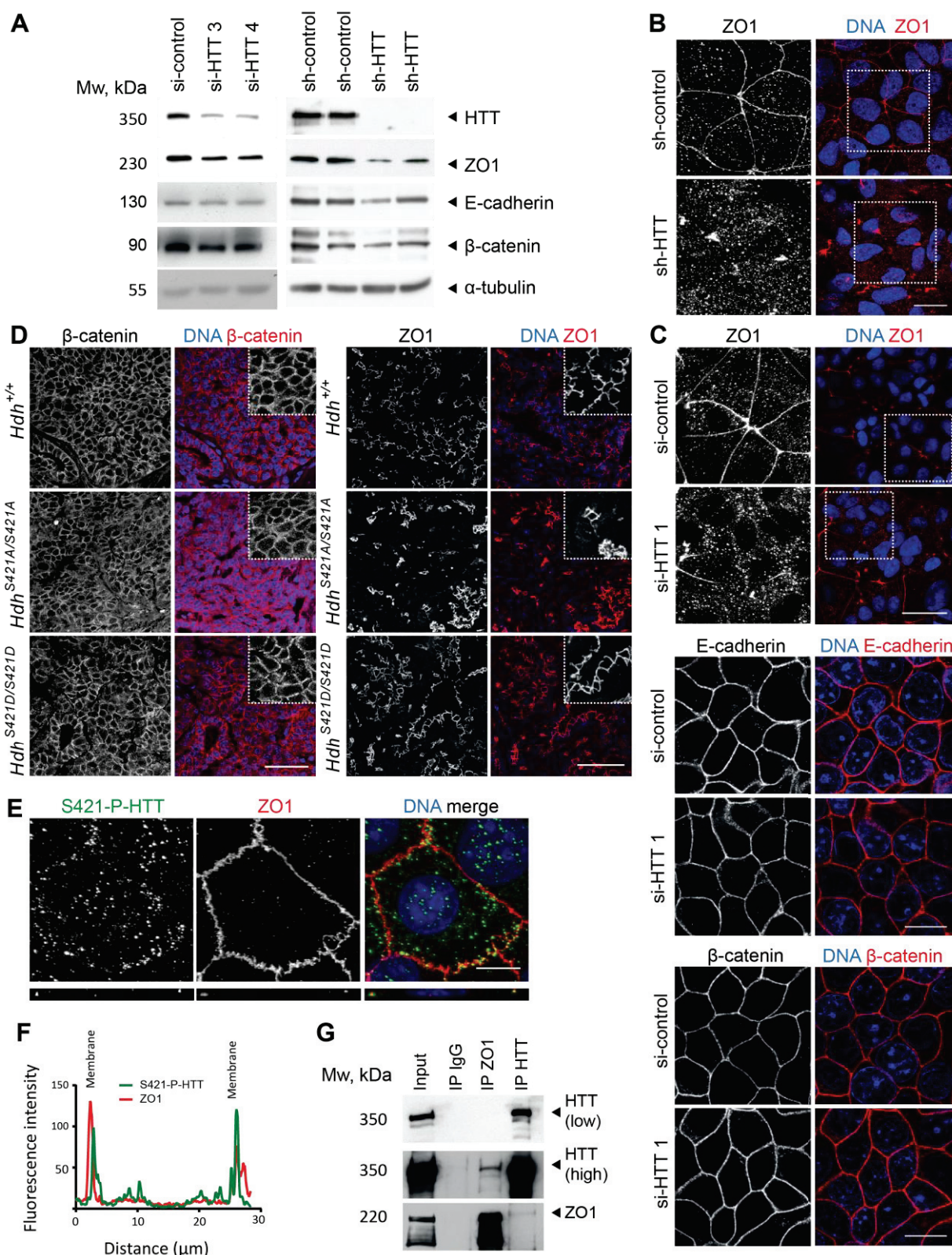


Figure 6. HTT Colocalizes and Interacts with ZO1 and Regulates its Localization at Tight Junctions

(A) Immunoblotting analysis of HTT, ZO1, E-cadherin, β-catenin and α-tubulin in scramble or HTT-depleted (as indicated) MCF7 cells. Two stable cell lines are shown (sh-HTT).

(B, C) sh- (B) and si- (C) HTT-depleted and control MCF7 cells stained as indicated. Scale bars ZO1, 40 μm; scale bars E-cadherin, β-catenin, 15 μm.

(D) Immunostainings of sections from MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+}, MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} tumors for endogenous β-catenin and ZO1. Scale bars, 60 μm.

(E) MCF7 cells stained as indicated and (F) line-scan analysis (relative fluorescence intensity). Scale bar, 10 μm.

(G) HTT/ZO1 complex was immunoprecipitated from MCF7 cells. Mouse IgG (IP IgG) was used as a negative control. High = high exposure, low = low exposure.

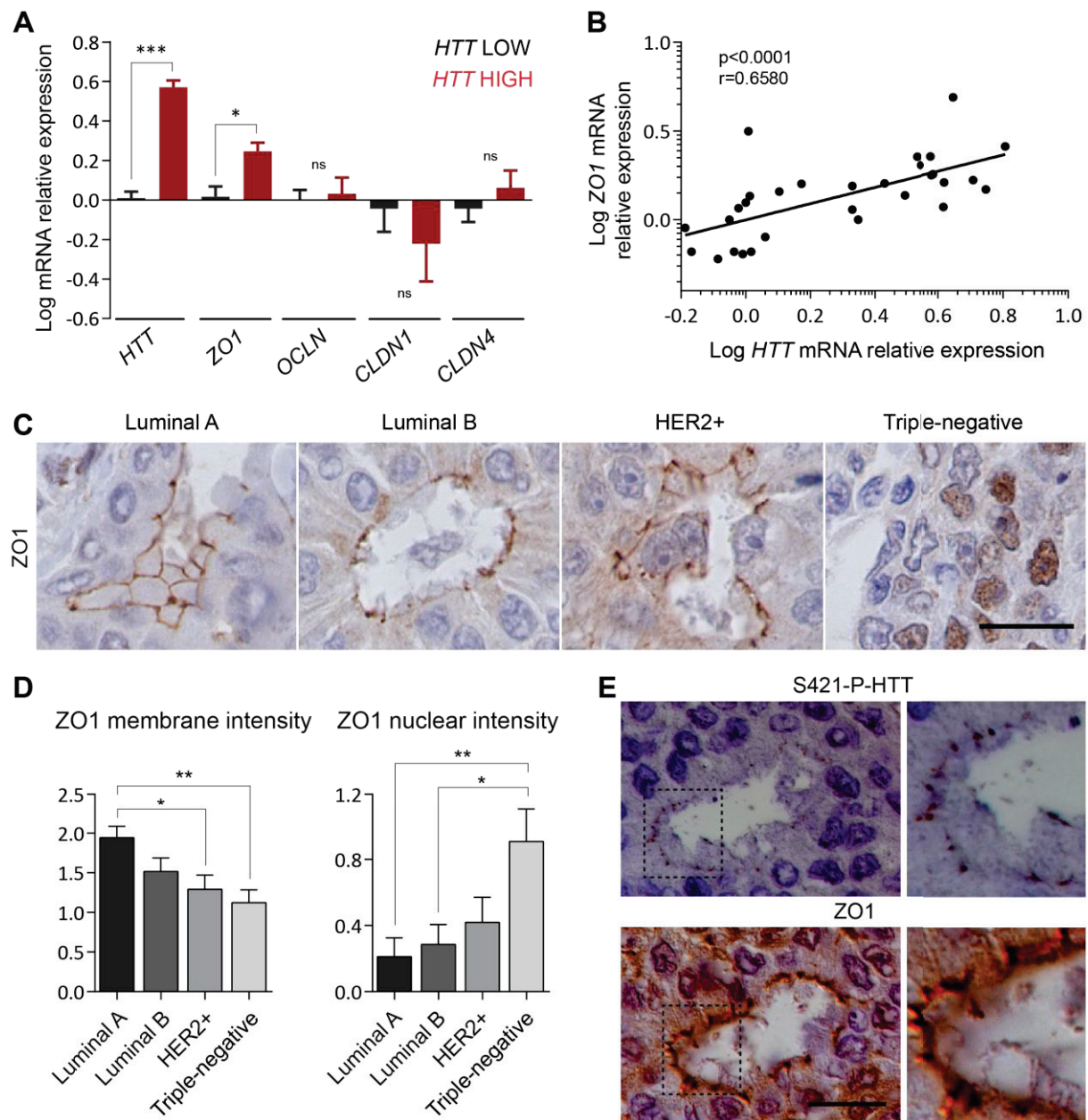


Figure 7. S421-P-HTT and ZO1 Colocalize at Cell-cell Junction in Human Breast Tumors

(A) mRNA expression levels of *HTT*, *ZO1*, *occludin* (*OCLN*), *claudin 1* (*CLDN1*) and *claudin 4* (*CLDN4*) in human breast tumors expressing high or low levels of *HTT* (cohort A; n=15 per group).

(B) Correlation curve between *ZO1* mRNA relative expression and *HTT* mRNA relative expression shown in (A).

(C) Representative staining of ZO1 in luminal A, luminal B, HER2-enriched and basal-like human breast tumors. Scale bar, 40 μ m.

(D) Semi-quantitative analysis of ZO1 membrane and nuclear intensity in luminal A (n=33), luminal B (n=35), HER2-enriched (n=31) and triple-negative (n=33) human breast tumors.

(E) Representative staining of S421-P-HTT (763) and ZO1 in serial section of *in situ* human breast tumors (n=11). Scale bar, 20 μ m.

Data are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, not significant.

DISCUSSION

The classic view is that HTT is an anti-apoptotic protein with major roles in transcription, axonal transport and spindle orientation (Caviston et al. 2007; Elias et al. 2014; Gauthier et al. 2004; Godin et al. 2010a; Zuccato et al. 2003). We also recently showed that wild-type HTT is essential for mammary morphogenesis (Elias et al. 2014) and that mutant HTT accelerates breast cancer development and metastasis (Moreira Sousa et al. 2013). We propose here that HTT acts on ZO1-dependent intercellular adhesion to regulate tumor cell dissemination and metastasis.

HTT expression increased from healthy mammary lobules to *in situ* carcinomas whereas S421-P-HTT decreased. In microinvasive and invasive cells as compared to *in situ* carcinomas, HTT and S421-P-HTT behaved similarly being markedly decreased. Even in the case of poorly differentiated breast tumors, cancer cells are adherent to each other and the loss of this adherence is a key step leading to metastasis. One could thus speculate that HTT upregulation in *in situ* carcinomas as compared to healthy tissue is a compensatory mechanism to maintain adhesion in the primary tumor, and avoid invasion due to the decreased HTT phosphorylation at S421. The question of what are the regulators of S421 phosphorylation in healthy tissue and breast carcinomas is complex. S421 is phosphorylated in neurons by the serine/threonine kinase AKT-1 and the serum and glucocorticoid-induced kinase-1 (SGK-1) kinase (Rangone et al. 2004). The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway is frequently over-activated in breast cancer (Cancer Genome Atlas 2012). For instance, PI3KCA mutation, AKT1 activating mutation and AKT2 amplification have been reported. This is somehow in contradiction with the fact that we observe a decreased phosphorylation of HTT in *in situ* tumors as compared to healthy tissue. Instead, it would suggest that other signaling pathways may be involved to regulate spatially and temporally S421 phosphorylation status in healthy tissue. Among the three AKT isoforms, two of them have been shown to participate to mammary tumorigenesis (Dillon et al. 2009; Maroulakou et al. 2007). In breast cancer mouse models, AKT1 favors proliferation and inhibits metastasis progression (Hutchinson et al. 2004; Maroulakou et al. 2007). Indeed, AKT1 decreases migration and invasion capacities of tumoral cells in culture (Irie et al. 2005; Yoeli-Lerner et al. 2005). In contrast, AKT2 inhibits proliferation and favors invasion and metastasis (Arboleda et al. 2003; Maroulakou et al. 2007). The specific effect of AKT1 on metastasis is in agreement with our data and the fact that AKT1 has been shown to phosphorylate HTT at S421 (Humbert et al. 2002). However this does not exclude that other kinases and signaling pathways are involved in regulating S421. For instance, SGK-1 could also phosphorylate HTT at S421 during cancer progression as its expression is positively regulated with that of AKT in human breast cancer (Sahoo et al. 2005).

HTT regulates the expression level and the localization of ZO1. Our data are consistent with a study showing that HTT-deficient mouse embryonic stem cells exhibit defects in the organization of neuroepithelial cells in neural rosettes and decreased level of N-cadherin and ZO1 (Lo Sardo et al. 2012). Also, reducing HTT levels in zebrafish embryos impairs N-cadherin-mediated adhesion and

leads to aberrant distribution of ZO1. There is evidence that HTT may play a crucial role in linking the microtubule and actin cytoskeletons. HTT in a HAP40-Optineurin-MyosinVI complex may regulate actin-dependent dynamics, whereas in complex with dynein-dynactin-kinesin it may regulate microtubule-dependent transport (Caviston and Holzbaur 2009). In particular, S421-P-HTT stimulates vesicular transport from the minus end to the plus end of microtubules (Colin et al. 2008). Thus, HTT could ensure the delivery and maintenance of junctional components at tight junctions. Interestingly, HTT is found complexed with other proteins involved in tight junctions like β -actin, spectrin and PAR3 (Shirasaki et al. 2012). HTT also binds to β -catenin (Godin et al. 2010b). However, in our experimental conditions, we did not see obvious modifications of adherens junctions. The levels and localizations of E-cadherin and β -catenin were only slightly modified in absence of HTT. This is reminiscent of the loss of other tight junctions proteins such as PAR3 that promotes metastasis without affecting E-cadherin expression and localization (McCaffrey and Macara 2009; Xue et al. 2013). Finally, in extreme situations, as observed in triple-negative tumors, loss of tight junctions would favor ZO1 localization into the nucleus. Nuclear accumulation of ZO1 has been reported to regulate cell cycle progression and cell proliferation in a density dependent manner through ZONAB (Balda et al. 2003).

We observed a concomitant downregulation of *HTT* and *ZO1* mRNA in poorly differentiated and metastatic breast tumors. In addition, HTT depletion led to the decreased expression of ZO1. Yet, the converse was not true (data not shown). How can HTT specifically regulates ZO1 transcription level? While ZO1 is one of the first tight junction protein described, surprisingly little is known regarding its transcriptional regulation. Chen and colleagues showed that the JunD transcription factor negatively regulates the expression of ZO1, subsequently modulating intestinal epithelial cellular permeability (Chen et al. 2008). This regulation occurs through the cAMP response element-binding protein (CREB) site of the ZO1 promoter. HTT interacts with the CREB binding protein, CBP (Steffan et al. 2000). While the effect of HTT on CBP mediated transcription are unknown, one can postulate that HTT by binding CBP could mediate CREB-dependent ZO1 transcription. Else, HTT could regulate the transport of ZO1 mRNA at the apical sites. Indeed, while apical concentration of proteins is generally thought to occur by protein sorting, a study reported that CBEP supplies ZO1 mRNA to apical sites to promote tight junction assembly (Nagaoka et al. 2012). CBEP is a sequence-specific RNA-binding protein that regulates polyadenylation-induced translation. Given its role in regulating intracellular dynamics, HTT could transport a CPEB-mRNA complex at apical sites.

What are the molecular mechanisms underlying HTT down-regulation in poorly differentiated and metastatic breast cancer? To our knowledge, *HTT* gene, localized on chromosome 4p16.3, shows very rare mutation or deletion or amplification (<1%) (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013). HTT interacts with the tumor suppressor protein P53 that is found mutated in numerous breast carcinomas (Feng et al. 2006; Petitjean et al. 2007; Steffan et al. 2000). P53 positively regulates HTT expression and is mostly found mutated in basal breast carcinomas (Cancer Genome Atlas 2012), suggesting that it could participate to the decrease HTT expression found in this subtype.

Alternatively, downregulation of HTT expression could result from increased hypermethylation of HTT promoter or miRNAs dysregulation. While the regulation of HTT promoter remains to be investigated, several miRNAs which have been predicted to target HTT are up-regulated in basal-carcinomas and/or metastatic carcinomas and could mediate their effects through the regulation of HTT expression (Cascione et al. 2013; Tang et al. 2012; Volinia et al. 2012).

HTT interacts with a number of binding partners known to be pro-oncogenic. For instance, HTT interacting protein 1, HIP1, is overexpressed in prostate, breast, and colon cancer (Rao et al. 2002). HIP1 acts as a prosurvival factor and its expression is associated with metastasis development and poor prognosis in prostate cancer. HTT interacting protein 14 (HIP14), is a palmitoyl acyltransferase inducing tumors in mice (Ducker et al. 2004). HTT associated protein 1, HAP1, is lowered in breast carcinoma as compared to healthy mammary tissue and inhibits cell migration and invasion (Zhu et al. 2013). Thus, considering the complexity of the biological processes involved in breast cancer, HTT could also mediate some of its effect during tumorigenesis and metastasis through such partners. Nevertheless, our description of an unexpected role of wild-type HTT in mammary cancer could shed light onto novel pathways involved in breast cancer metastasis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Patients and tumors samples

Cohort A: 449 consecutive primary unilateral invasive primary breast tumors excised from women at the Institut Curie/René Huguenin Hospital (France) between 1978 and 2008. All patients admitted before 2007 were informed that their tumor samples might be used for breast cancer progression studies and they were given the opportunity to refuse the use of their samples. Since 2007, patients have also given their approval by signing an informed consent form. This study was approved by the local ethics committee (Breast Group of René Huguenin Hospital). The samples were examined histologically for the presence of tumor cells and considered suitable if the proportion of tumor cells was strictly above 70%. Immediately following surgery, the tumor samples were stored in liquid nitrogen until RNA extraction. The patients met the following criteria: primary unilateral non-metastatic breast carcinoma for which complete clinical, histological and biological data were available; no radiotherapy or chemotherapy before surgery; and full follow-up at Institut Curie/René Huguenin Hospital. The clinical characteristics of patients cohort have been reported elsewhere (Awadelkarim et al. 2012; Bieche et al. 2001). We subdivided our total population (n=449) into four sub-groups: the “luminal” subtype expressed hormonal receptors (HR; ER+ or PR+) and showed no amplification of HER2 (n=286); the “luminal B/HER2+” subtype expressed HR (ER+ or PR+) and displayed an overexpression of the HER2 receptor (n=54); the “HER2+” subtype did not express HR but was positive for HER2 (ER- and PR-/HER2+, n=42); and the “triple negative” subtype was negative for HR and for HER2 overexpression (ER- and PR-/HER2-, n=66). Standard prognostic factors of this tumor set are presented in table S1. The median of follow-up was 8.9 years (range 6 months to 29 years).

Cohorts B, C and D: Samples of primary breast tumors surgically removed prior to any radiation, hormonal or chemotherapy treatment at Institut Curie from 2005 to 2006. Our series of invasive breast tumors for which acidified formal alcohol (AFA)-fixed paraffin-embedded samples were available comprised all TNBC and HER2 tumors available and equal number of consecutively treated Luminal A and Luminal B tumors from the same period following the same criteria. Breast molecular subtypes were defined as follows: Luminal A+B according to (Prat et al. 2013): (Luminal A: estrogen-receptor (ER)≥10%, progesterone-receptor (PR)≥20%, Ki-67<14%; Luminal B: ER≥10%, PR<20%, Ki-67≥14%); ER- PR- HER2+: ER<10%, PR<10%, HER2 2+ amplified or 3+; ER- PR- HER2- (Triple negative breast cancers, TNBCs): ER<10%, PR<10%, HER2 0/1+ or 2+ non-amplified according to the ASCO guidelines (Wolff et al. 2007). The clinical and pathological features of patients of cohorts C and D are summarized in table S3. TMA consisted of replicated 1mm-diameter tumor cores selected from whole tumor tissue section in the most representative tumor areas (high tumor cell density) of each tumor sample and a matched tissue core from adjacent non-tumoral breast epithelium (referred to as normal breast tissue). Analysis of human samples were performed in accordance with the French Bioethics Law 2004-800, the French National Institute of Cancer (INCa) Ethics Charter and after

approval by the Institut Curie review board and ethics committee (*Comité de Pilotage du Groupe Sein*) that waived the need for written informed consent from the participants. Women were informed of the research use of their tissues and did not declare any opposition for such research. Data were analyzed anonymously.

Cohort E: Human tissue samples from the Biological Resource Center (Centre Léon Bérard, Agreement number: DC-2008-99), after approval by the institutional review board and ethics committee of Centre Léon Bérard, with fully informed patient consent. The pathologist selected representative areas from breast carcinomas.

Quantitative RT-PCR on Human Breast Tumor Samples

Cohort A: Total RNA was extracted from breast samples by using acid-phenol guanidium method (Chomczynski and Sacchi 1987). The quality of the RNA sample was determined by electrophoresis through agarose gels staining with ethidium bromide and visualization of the 18S and 28S RNA bands under ultraviolet light. The primers *HTT* (upper primer, 5'-CAGCTCTGCCTTAACAGCCTCA-3'; lower primer, 5'-AAGAAGCAGCCAGCTCTCCACT-3'), *ZO1* (upper primer, 5'-AAACACCTTCTCTCCAGAACCA-3', lower primer, 5'-GGACACCATCAGATGGACTGACA-3'), *OCN* (upper primer, 5'-CCCAATGTCGAGGAGTGGGTGA-3'; lower primer, 5'-AGTATGCCATGGGACTGTCAACTCT-3'), *CLDN1* (upper primer, 5'-TATTCTTCTTGCAGGTCTGGCTA-3'; lower primer, 5'-CAAATTCGTACCTGGCATTGACT-3'), *CLDN4* (upper primer, 5'-ATGCAGTGCAAGGTGTACGACTC-3'; lower primer, 5'-GCAGCCACGATGATGCTGAT-3'), *TBP* (upper primer, 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'; lower primer, 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3') were selected with the assistance of the Oligo 6.0 program (National Biosciences, Plymouth, MN). dbEST and nr databases were scanned to confirm the total gene specificity of the nucleotide sequences chosen and the absence of single nucleotide polymorphisms. To avoid amplification of contaminating genomic DNA, one of the two primers was placed at the junction between two exons. Agarose gel electrophoresis was used to verify the specificity of PCR amplicons. The conditions of cDNA synthesis and PCR were previously described (Bieche et al. 2001).

Quantitative values were obtained from the cycle number (Ct value) at which the increase in the fluorescence signal associated with exponential growth of PCR products started to be detected by the laser detector of the ABI Prism 7900 sequence detection system (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA), using PE biosystems analysis software according to the manufacturer's manuals.

The precise amount of total RNA added to each reaction mix (based on optical density) and its quality (lack of extensive degradation) are both difficult to assess. Therefore, transcripts of the *TBP* gene (Genbank accession NM_003194) encoding the TATA box-binding protein (a component of the DNA-binding protein complex TFIID) were also quantified as an endogenous RNA control. Each sample was normalized on the basis of its *TBP* content. *TBP* was selected as an endogenous control due to the

moderate level of its transcripts and the absence of known *TBP* retropseudogenes (retropseudogenes lead to coamplification of contaminating genomic DNA and thus interfere with RT-PCR, despite the use of primers in separate exons) (Bieche et al. 1999).

Results, expressed as N-fold differences in target gene expression relative to the *TBP* gene and termed " N_{target} ", were determined as $N_{\text{target}} = 2^{\Delta C_{\text{t sample}}}$, where the ΔC_{t} value of the sample was determined by subtracting the average C_{t} value of target gene from the average C_{t} value of *TBP* gene.

Cohort E: To assay HTT expression in breast tumors, total RNA was isolated and reverse-transcribed using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad). The hydrocymethylbilane synthase (HMBS) housekeeping gene was used as internal control. Real-time quantitative RT-PCR was performed on a LightCycler 480 apparatus (Roche) using the LightCycler TaqMan Master kit (Roche) and probes 42, 25, 5, and 26, respectively (Universal ProbeLibrary; Roche). Average gene expression is given as a ratio between expression in each sample and the average of the expression in the NO samples. Immunohistological analysis was performed as described in (Bernet et al. 2007).

Antibodies

The antibodies used in this study were as follows: monoclonal mouse anti-htt 4C8 (Euromedex); monoclonal rabbit anti-htt-D7F7 (Cell Signaling); rabbit anti-S421-P-HTT (human 763, mice 3519); mouse anti- β -catenin (BD Transduction Laboratories); monoclonal mouse anti-E-cadherin (BD Transduction Laboratories); monoclonal anti-ZO1 (BD Transduction Laboratories and Invitrogen); monoclonal anti- α -tubulin (Sigma); polyclonal rabbit anti-cleaved caspase-3 (Cell Signaling); polyclonal rabbit anti-Ki-67 (Leica); rabbit anti-firefly luciferase (Abcam); polyclonal mouse IgG (Millipore) and anti-p63 (Eurobio). Secondary antibodies for immunofluorescence studies were anti-mouse and/or anti-rabbit antibodies conjugated to Alexa 488, Alexa 555 and Alexa 647 (Invitrogen). Secondary antibodies for western blots were HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit antibodies from Invitrogen.

Cell Culture

Cells were cultured in humidified incubators at 37°C and 5% CO₂. Metastatic 4T1-luc mouse cancer cells were maintained in DMEM with 10% fetal calf serum, 1X MEM non-essential amino acids, 100 units/mL penicillin/streptomycin, 250 ng/mL Fungizone (Gibco), and 400 mg/ml Hygromycin B (Invitrogen). Human mammary carcinoma cell lines MCF7 cells were maintained in DMEM with 10% fetal calf serum, 100 units/mL penicillin/streptomycin and 0.1% sodium pyruvate (Gibco). MCF7 cells were transduced with lentiviral construction containing sh-control or sh-HTT. Single GFP positive cell were cell sorted using FACsCalibur (Becton Dickinson) and put in a 96 well plate in order to have clonal stable cell line expressing either sh-control or sh-HTT. Three independent cell lines were grown for each condition. Primary cells from MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+}, MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} and MMTV-

PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} tumors were cultured as described (Dangles-Marie et al. 2007) maintained at 8% CO₂ in DMEM supplemented with 10% foetal calf serum, 10 mmol/L HEPES buffer (Sigma), 1mmol/L Sodium Pyruvate (Sigma), 100 units/ml penicillin/streptomycin (Gibco), 250 ng/ml Fungizone (Gibco). For the first three passages, 200 µg/ml Gentamicin (Gibco) was added to the media.

Plasmids, siRNA and Transfections

The following pairs of RNA oligonucleotides for siRNA (Eurogentec) were used : Mohtt361-sens (5'-GGAACUCUCAGCCACCAAG-3') and Mohtt361-antisens (5'-CUUGGUGGCUGAGAGUUC-3') for si-HTT1; Mohtt4325-sens (5'-UUACUGUCUACUGGAUUC-3') and Mohtt4325-antisens (5'-UGAAUCCAGUAGACAGUA-3') for si-HTT2.

The following pairs of oligonucleotides were used in human cells: HuHtt585-sens (5'-aacuuucagcuaccaagaaag-3') and HuHtt585-antisens (5'-CUUUCUUGGUAGCUGAAAGUU-3') for si-HTT3; HuHtt4487-sens (5'-GCAGGUUUUAGAUUUGCUG-3') and HuHtt4487-antisens (5'-CAGCAAUUCUAAAACCUGC-3') for si-HTT4; HuZO1#1-sens (5'-GUUAUACGAGCGAUCUCAU-3') and HuZO1#1-antisens (5'-AUGAGAU CGCUCGUAUAAC-3') for si-ZO1-1; and HuZO1#2-sens (5'-GACGAGAUAAUCCUCAUUU-3') and HuZO1#2-antisens (5'-AAAUGAGGAUUAUCUCGUC-3') for si-ZO1-2.

For 4T1 *in vivo* tail vein experiment, the siRNA negative control was a previously used sequence containing no homology to known sites of the mouse genome (GAUAGCAAUGACGAAUGCGUA). For all other experiments, the siRNA negative control (si-control) was from Eurogentec (OR-0030-neg05). The sh-HTT construct was described elsewhere (Drouet et al. 2009). Briefly, the small hairpin RNA targeting the human HTT (sh-HTT) recognizes a region within exons 8-9 and is transcribed from the polIII H1 promoter (AGCTTTGATGGATTCTAA-TCTCTTGAA-ATTAGAATCCATCAAAGCT). Within the same plasmid is a separate expression cassette encoding the eGFP reporter gene under the control of the mouse PGK promoter. The sh-control construct is identical apart from its hairpin recognizing a sequence within the firefly luciferase gene (CGTACGCGGAATACTTCGA-TGACAGGAAGTCGAAGTATTCCGCGTACG) rather than a sequence within HTT. The pARIS-mcherry-HTT (FLHTT) plasmid was described elsewhere (Pardo et al. 2010).

Transfections were carried out as follows. For 4T1 random migration assays, cells were lipofected (LipofectamineTM 2000, Invitrogen) 48-72 hours before assays. For MCF7 cells adhesion analysis, cells were lipofected (LipofectamineTM 2000, Invitrogen) 48 h before lysis.

Cell Motility

Random migration experiments were carried out in 4T1 and primary tumor cells. Cells in plastic 6-well plates were transfected and then imaged over at least 6 h using an inverted fluorescent 2D Leica DM IRB microscope with photometric CoolSNAP fx camera in a chamber with controlled temperature and CO₂ conditions and a moving stage. This system allows for the storage of cell coordinates so that

many cells at different positions can be followed during the same time-course. For sh-control and sh-HTT random migration assay, transfected cells were identified by fluorescence imaging. Dividing cells were excluded from analysis. The cell tracking plug-in of ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/track/track.html>) was then used to calculate parameters of cell motility.

Scratch assays were performed in 4T1 and MCF7 cells. Transfected cells were grown 2-3 days until confluence. Then, a 200 μ L pipet tip was used to scratch the confluent monolayer. Cells were then imaged for 48 h using the same microscope configuration as described for random migration assays. ImageJ software was used to measure the distance between the two columns of cells at specific timepoints. In all cases, the *in vitro* doubling times for the cells within each condition were confirmed to be the same.

For Boyden chambers assays (353097, BD Biosciences), 5×10^3 cells were loaded per insert. Chambers were left for 6 h at 37% and 5% CO₂ and then fixed and stained in 0.5% crystal violet (in 20% methanol). Images of each chamber were taken using a light microscope and cells were counted.

Matrigel Invasion

Matrigel invasion assays were performed in matrigel Boyden chambers (354483, BD Biosciences). 3×10^4 serum-starved cells were loaded in media containing 0.1% serum in the insert while the well was filled with media containing 10% serum. Chambers were left for 18 hr at 37% and 5% CO₂ and then fixed and stained in 0.5% crystal violet (in 20% methanol). Images of each chamber were taken using a light microscope and cells were counted.

Anoikis assay

For anoikis experiments, 5×10^5 cells were cultured in suspension for 16 h (37°C; 8% CO₂). Cells were stained with V-FITC and/or propidium iodide (556547, BD Biosciences). Cytometric analysis was performed on FACScalibur (Becton Dickinson). Fifteen thousand events were analysed using CellQuest (Becton Dickinson) and Flowjo software.

***In vivo* Metastasis**

The *in vivo* metastasis assay was done using 4T1-luc cells injected into syngenic BALB/C mice as described previously (Fitamant et al. 2008). Briefly, 100,000 cells resuspended in 150 μ L of PBS were tail-vein injected. 4 μ g of si-control or si-HTT1 was intraperitoneally injected each day for ten days, starting with the day of the cell injections. Each day, beginning at day 4, luciferin was administered to the mice, and bio-luminescence imaging was performed, and the lung signal was quantified. Statistical differences in lung signal intensity were determined by Mann-Whitney U post-hoc analysis. Survival Assays were performed in compliance with French animal research ethical standards: when

mice lost more than 15% of their pre-treatment weight due to the effects of the cancer cells, they were euthanized. The day of euthanasia was recorded as their last day of survival. Control mice treated with si-control or si-HTT1, but never injected with 4T1-luc cells, never showed any loss of weight during the course of the study. Kaplan-Meier survival plots were evaluated by a log-rank analysis for statistical significance.

Mice

Hdh^{+/+}, *Hdh*^{S421A/S421A} and *Hdh*^{S421D/S421D} (Bl6 background) are knock-in mice displaying a point mutation at serine 421 of HTT replaced either with an alanine to mimic a loss of phosphorylation *Hdh*^{S421A/S421A} or by an aspartic acid to mimic a constitutive phosphorylation *Hdh*^{S421D/S421D}. These HTT mutant mouse lines were established at the MCI/ICS (Institut Clinique de la Souris, iCS, Infrastructure Nationale PHENOMIN, 1, rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France). The targeting vector was constructed as follows : a 4.5 kb fragment corresponding to the 5' homology arm and the a 3.2 kb fragment corresponding to the 3' homology arm were amplified by PCR and subsequently cloned in an MCI proprietary vector plasmid containing a floxed Neomycin selection cassette. Distinct 0.6 kb fragments including exon 9 and one or the other point mutation (AGC>GCC ; Ser>Ala or AGC>GAC; Ser>Asp) were generated par base substitution mutagenesis by PCR overlap extension and subcloned into the plasmid obtained after the 2 previous steps to generate the final targeting constructs. The linearized constructs was electroporated in 129S2/SvPas mouse embryonic stem (ES) cells. After selection, targeted clones were identified by Long-Range PCR and further confirmed by Southern blot with Neo, 3' and 5' external probes. Two positive ES clones par project were microinjected into C57Bl/6N blastocysts, and derived male chimeras were crossed with a Cre deleter mice in order to obtain germ line transmission. The Cre transgene was segregated with a further breeding step.

FVB/N-Tg(MMTV-PyVT)634Mul/J were obtained from The Jackson Laboratory (Jackson Labs line 2374: FVB/N-Tg(MMTV-PyVT)634Mul/J). For tumor-free survival assays, mice were surveyed for tumor appearance by palpation. Mice were sacrificed at 16 weeks of age and tumor progression was analysed.

Immunofluorescence

For immunofluorescence on tissues, samples were processed for immunofluorescence imaging by cryostat sectioning and adhering to Thermo Scientific Superfrost glass slides. To verify whether 4T1-luc cells from the *in vivo* metastasis assay were indeed knocked-down for HTT from the intraperitoneal injections of si-HTT, lungs were dissected and then frozen in liquid nitrogen. Sections were then fixed in 4% paraformaldehyde and blocked for three days to remove any autofluorescence in 1% BSA + 0.1% triton X-100 + 0.15% glycine. Samples were then probed with antibodies against luciferase (1:500) and HTT (4C8 1:400). For microscopic analysis of mammary tumors, tumors were dissected and immediately placed in liquid nitrogen. Samples were sectioned using a Cryostat to

make sections of 7 μm and then fixed in methanol/acetone solution previously cold at -20°C . Antigen retrieval was performed by boiling the slides for 20 min in a microwave in 10 mM citrate buffer (pH 6). Sections were stained overnight for ZO1 (1:50), E-cadherin (1:1000) and β -catenin (1:200).

For analysis of S421-P-HTT in MCF7 cells, cells were first fixed with 10% trichloroacetic acid for 7 min then cells were fixed for 10 min in cold methanol (-20°C) and washed 3 times before immunostaining. Otherwise, cells were fixed in 4% paraformaldehyde. The antibodies used were raised against HTT (2174, 1:300), S421-P-HTT (3519, 1:50), ZO1 (1:50), E-cadherin (1:500) and β -catenin (1:200) as indicated. For all immunostainings, the slides were counterstained with DAPI (Roche) and mounted in Mowiol.

Images were captured with a Leica SP5 laser scanning confocal microscope equipped with a 63X objective lens. Z-stack steps were of 0.2 μm . Images were treated with ImageJ.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry on human samples, all steps were performed on an automated stainer (Dako Autostainer plus). Paraffin sections (3 mm thick) of TMAs were deparaffinized before heat-induced epitope retrieval heating for 20 min in EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high pH (pH 9). Then, endogenous activity was blocked with a 3% hydrogen peroxide solution following by incubation with anti-S421-P-HTT (763, 1:75) or anti-HTT (4C8, 1:500 or D7F7, 1:100) or anti-ZO1 (Invitrogen, 1:50) or anti-p63 (1:200). Staining was detected with the standard detection kit EnVision™ FLEX/HRP (Dako) with diaminobenzidine as chromogen. Slides were counterstained with hematoxylin before mounting.

MMTV-PyVT mammary murine tumors were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde. Samples were imbedded in paraffin and section of 7 μm mounted on glass slides were deparaffinized, demasked in citrate buffer 10mM pH 6.0 (90°C , 20min), probed with antibodies against cleaved-caspase-3 (1:200), Ki67 (1:500) amplified with the Vectastain ABC kit and revealed using DAB. Slides were counterstained with Hematoxylin.

Immunoblotting

All protein extracts in this study were generated by lysing samples in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2mM EGTA, 50 mM sodium fluoride, 10mM β -glycerophosphate, 5 mM sodium pyrophosphate, 1mM sodium orthovanadate, 0.1% Triton X-100, 1X Sigma protease inhibitor cocktail, 1X Sigma phosphatase inhibitor cocktail), and centrifuged at 10000 x g for 10 min at 4°C . After protein quantification, proteins were loaded onto SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) and subjected to Western blot analysis.

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation experiments were performed using MCF7 cell extracts. Briefly, cells were lysed in IP buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.5; 137 mM NaCl; 1% Triton X-100; 10mM MgCl₂; 10% glycerol; 1% protease inhibitor cocktail (Sigma), 1% phosphatase inhibitor cocktail (Sigma). Lysates were precleared at 1 h at 4°C with 30µL of protein G beads (Sigma). 1 mg of extracts were incubated overnight at 4°C with 10 µg of anti-HTT (4C8), anti-ZO1 (BD transduction laboratory) or anti-IgG mouse antibody prebound with 30µl of protein G beads. Beads were washed three times in IP buffer. Bound proteins were eluted with SDS loading buffer, resolved by SDS-PAGE and then subjected to immunoblotting analysis.

Carmine Aluminum Whole Mount Staining

For whole mount analysis, the fourth pairs of mammary gland fat pads were dissected from female mice at twelve-week of age. The left fourth mammary gland fat pads were spread on slides and fixed overnight in a methacarn solution containing 60% methanol, 30% chloroform and 10% acetic acid. Samples were then washed in 100% methanol before rehydrating and subsequent overnight staining in carmine alum solution (StemCell Technologies). Samples were dehydrated and destained in xylene and scanned using an Epson Perfection 3200 scanner.

Statistical analysis

All analyses were performed with SAS version 9.3 or Prism software and p-values of 0.05 and below were considered.

Normality of data distribution was verified by graphical analysis of the data distribution and residues. For data with normal distribution, groups were compared by unpaired t tests or ANOVA followed by Tukey's post hoc analyses for multiple comparisons and Pearson correlation tests were used to investigate the association between two continuous variables. When distribution of data was abnormal, groups were compared by Mann and Whitney test or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc tests for multiple comparisons.

Metastasis-free survival (MFS) was defined as the interval of time between surgery and detection of the first metastasis for patients who developed a metastatic disease and time between surgery and last checkup for patients without metastasis. Survival distributions were estimated by the Kaplan-Meier method, and the significance of differences between survival rates was ascertained using a log-rank test. Cox proportional hazard univariate analyses were used to evaluate risk factors for the development of metastasis in the whole cohort. For the whole cohort analysis, the following variables were included in the analysis: age at cancer diagnosis, macroscopic tumor size, SBR tumor grade, lymph node status, ER, PR and HER2 status, and consequently, molecular subtype, as well as *HTT* mRNA expression.

Complete statistical analyses are available in the Supporting Information.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data includes three tables, two figures, complete statistical analyses with number of measures.

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly acknowledge F. Saudou, M. Dutreix for reagents and/or discussions; staffs of Institut Curie imaging and animal facilities; C. Lasgi (Institut Curie Flow cytometry facility); members of the Humbert and Saudou's laboratories for helpful comments. The authors greatly acknowledge Ludovic Leconte and the Nikon Imaging Centre at Institut Curie-CNRS (Institut Curie, Paris) as well as the patients for the biological samples. This work was supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche - Maladies Rares (ANR-09-BLAN-0080, S.H.), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC subvention libre n°3188, S.H.), CNRS, INSERM and Institut Curie. M.S.T. was supported by a MENRT doctoral fellowship and an ARC fellowship. C.M.S. was supported by a Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) doctoral fellowship (SFRH / BD / 60728 /2009). S.H. is a INSERM investigator.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data includes three tables, two figures, complete statistical analyses with number of measures.

Table S1. Cohort A: characteristics of the 449 breast cancer relative to mRNA expression of *Huntingtin (HTT)*.

Variables	n (%)	Mean log <i>HTT</i> mRNA expression (standard deviation)	<i>p</i>
Total	449 (100)	0.37 (0.44)	
Age (years)	449 (100)	-	$r=0.152$ $p=0.001$
Macroscopic tumor size (mm)	441 (98.2)		
≤ 25	220 (49.9)	0.41 (0.43)	0.056
>25	221 (50.1)	0.33 (0.45)	
SBR histological grade^a	440 (98)		
I	57 (13.0)	0.40 (0.36)	<0.0001
II	227 (51.6)	0.44 (0.42)	
III	156 (35.4)	0.24 (0.47)	
Lymph node status	448 (99.8)		
0	117 (26.1)	0.37 (0.51)	0.76
1-3	234 (52.2)	0.38 (0.41)	
>3	97 (21.6)	0.34 (0.42)	
ER status	449 (100)		
Negative	114 (25.4)	0.13 (0.43)	<0.0001
Positive	335 (74.6)	0.45 (0.42)	
PR status	449 (100)		
Negative	190 (42.3)	0.27 (0.48)	<0.0001
Positive	259 (57.7)	0.44 (0.39)	
HER2 status	449 (100)		
Negative	352 (78.4)	0.35 (0.42)	0.08
Positive	97 (21.6)	0.44 (0.49)	
Molecular subtypes	449 (100)		
Luminal	286 (63.7)	0.42 (0.39)	<0.0001
Luminal B/HER2+	54 (12.0)	0.59 (0.50)	
HER2+	43 (9.6)	0.25 (0.42)	
Triple-negative	66 (14.7)	0.06 (0.44)	

^a Scarff Bloom Richardson classification.

Table S2. Cohort C: characteristics of the 454 breast cancer relative to expression of Huntingtin (HTT).

Variables	n (%)	HTT H score Median (min- max)	P
Total	454 (100)	100 (62.5-150)	-
Age (years)	454 (100)	-	r=0.584 p=0.0257
Macroscopic tumor size (mm)			
≤20	303 (66.8)	100 (75-150)	0.0054
>20	151 (33.3)	100 (50-1220)	
SBR histological grade^a			
I	80 (17.7)	150 (100-200)	<0.0001
II	131 (29.0)	100 (100-150)	
III	241 (53.3)	100 (50-120)	
Lymph node status			
0	250 (55.6)	100 (50-150)	0.1242
1-3	135 (30.0)	100 (75-150)	
>3	65 (14.4)	100 (75-150)	
ER status			
Negative	195 (42.9)	80 (50-110)	<0.0001
Positive	259 (57.1)	110 (100-150)	
PR status			
Negative	225 (49.6)	100 (50-120)	<0.0001
Positive	229 (50.4)	120 (100-150)	
HER2 status			
Negative	364 (80.2)	100 (65-150)	0.4064
Positive	90 (19.8)	100 (50-150)	
Molecular subtypes			
Luminal A	133 (29.3)	150 (100-165)	<0.0001
Luminal B	113 (24.9)	100 (75-150)	
Luminal B/HER2+	14 (3.1)	110 (100-160)	
HER2+	76 (16.7)	100 (50-150)	
Triple-negative	118 (26.0)	75 (50-100)	

^a Scarff Bloom Richardson classification.

Table S3. Cohorts B, C and D: characteristics of breast cancer.

Variables	Cohort B Invasive carcinoma (n=172)	Cohort C Invasive carcinoma (n=454)	Cohorte D Microinvasive carcinoma (n=44)
SBR histological grade^a			
I	35	80	-
II	4	132	-
III	132	240	-
Unknown	1	2	-
Nuclear grade^b			
High	-	-	35
No high	-	-	9
Histological subtype			
Ductal carcinoma	161	444	-
Lobular carcinoma	1	4	-
Others	10	6	-
Macroscopic tumor size (cm)			
Tis	-	-	-
T1mic	-	-	44
T1 (<2)	78	304	-
T2 (2-5)	74	133	-
T3 (>5)	12	14	-
T4	8	3	-
N stage			
N0	69	250	-
N1	58	134	-
N2	29	51	-
N3	9	15	-
Unknown	7	3	-
ER status			
Positive	83	259	22
Negative	89	195	22
PR status			
Positive	58	229	17
Negative	109	225	27
Unknown	5	-	-
HER2 status			
Positive	73	90	26
Negative	99	364	18
Ki67 status			
Positive (≥20%)	30	333	27
Negative (<20%)	43	121	16
Unknown	99	-	1
Molecular subtypes			
Luminal A	83	133	9
Luminal B	-	113	9
Luminal B/HER2+	-	14	7
HER2+	37	76	16
Triple-Negative	52	118	3
Unknown	-	1	0

^a Scarff Bloom Richardson classification for invasive tumors.

^b For microinvasive carcinomas.

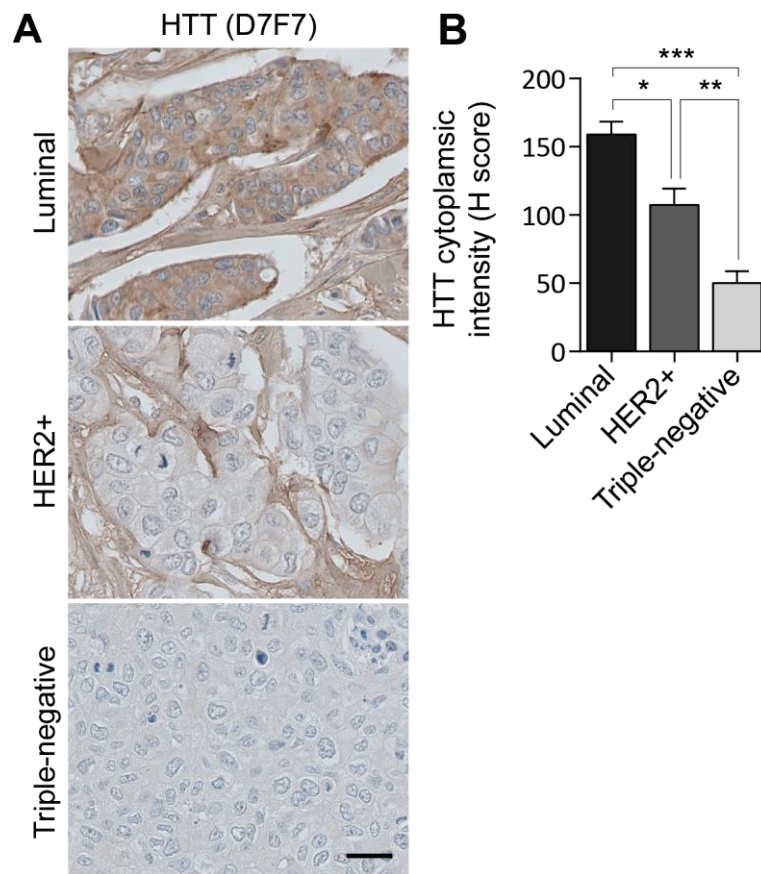


Figure S1. HTT Expression is Downregulated in Human Breast Cancers

(A) Representative staining of total huntingtin (D7F7) in luminal, HER2-enriched and triple-negative human breast tumors from cohort B. Scale bar, 20 μ m.

(B) Semi-quantitative analysis of HTT expression (H score) in luminal (n=67), HER2-enriched (n=34) and triple-negative (n=45) human breast tumors from cohort B.

Data are mean \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

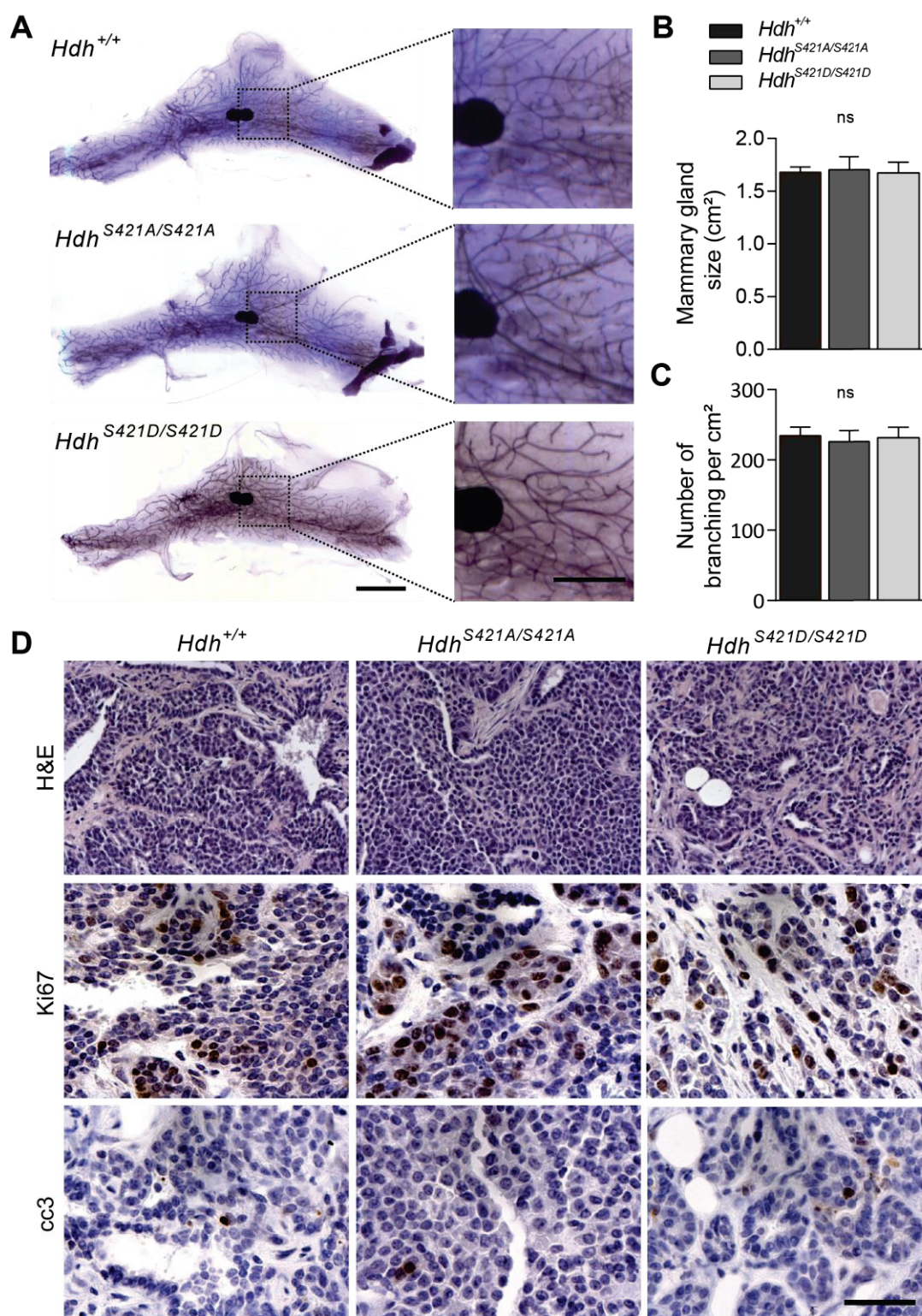


Figure S2. Phosphorylated huntingtin mammary glands development

(A) *In toto* 12 weeks MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} (*Hdh*^{+/+}), MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} (*Hdh*^{S421A/S421A}) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} (*Hdh*^{S421D/S421D}) mammary gland staining in carmine aluminium. General (left side) and detailed views (right side). Scale bar, 0.3cm.

(B) Average 12-week mammary glands size from MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} (*Hdh*^{+/+}, n=16), MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} (*Hdh*^{S421A/S421A}, n=6) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} (*Hdh*^{S421D/S421D}, n=7) mice.

(C) Average number of branches per cm² of 12-week mammary glands MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} (*Hdh*^{+/+}, n=16), MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} (*Hdh*^{S421A/S421A}, n=6) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} (*Hdh*^{S421D/S421D}, n=7) mice.

(D) Hematoxylin and eosin staining and immunohistochemical staining with antibodies against Ki67 and cleaved caspase-3 (cc3) of sections from MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} (*Hdh*^{+/+}), MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} (*Hdh*^{S421A/S421A}) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} (*Hdh*^{S421D/S421D}) mammary tumors (thoracic mammary gland, 16 weeks). Scale bar, 40μm.

Data are mean ± SEM. ns, not significant.

Statistical Analyses

Figure 1A

Data are from 63 luminal, 30 HER2+ and 37 triple-negative human breast cancer samples.

ANOVA $F[2,127]=19.81$; $p<0.0001$

Tukey's Post Hoc test:

Luminal vs HER2+; $p=0.0002$

Luminal vs Triple-negative; $p<0.0001$

HER2+ vs Triple-negative; $p=0.4589$

Figure 1B

Data are from 62 luminal, 31 HER2+ and 44 triple-negative human breast cancer samples.

Kruskal-Wallis, chi-square=73.97; $p<0.0001$

Dunn's Post Hoc test:

Luminal vs HER2+; $p=0.0027$

Luminal vs Triple-negative; $p<0.0001$

HER2+ vs Triple-negative; $p=0.0001$

Figure 1C

Data are from 111 human breast cancer samples.

Spearman correlation, $r=0.518$, $p<0.0001$

Figure 1F

Data are from 55 luminal, 27 HER2+, and 47 triple-negative human breast cancer samples.

Chi-square test, $p=0.0373$

Figure 2C

Data are from 114 human breast cancer samples.

Kruskal-Wallis, chi-square=49.63; $p<0.0001$

Dunn's Post Hoc test:

Healthy tissue vs in situ carcinoma: $p<0.0001$

Healthy tissue vs invasive carcinoma: $p>0.9999$

In situ carcinoma vs invasive carcinoma: $p<0.0001$

Figure 2D

Data are from 44 human breast cancer samples.

Kruskal-Wallis, chi-square=39.48; $p<0.0001$

Dunn's Post Hoc test:

Healthy tissue vs in situ carcinoma: $p<0.0001$

Healthy tissue vs invasive carcinoma: $p=0.1344$

In situ carcinoma vs invasive carcinoma: $p=0.0001$

Figure 2E

Data are from 44 human breast cancer samples.

Kruskal-Wallis, chi-square=29.47; $p<0.0001$

Dunn's Post Hoc test:

Healthy tissue vs in situ carcinoma: $p<0.0001$

Healthy tissue vs invasive carcinoma: $p>0.9999$

In situ carcinoma vs invasive carcinoma: $p<0.0001$

Figure 2F

Data are from 44 human breast cancer samples between healthy tissue, in situ carcinomas and invasive carcinomas.

Chi-square test, $p < 0.0001$

Figure 3A

Data are from 15 M0-N0, 40 M0-N1 and 14 M1 human breast tumor samples.

Unpaired t-test between M0 vs M1 samples, $p = 0.0446$

Figure 3B

Data are from 15 human breast cancer samples expressing low levels of HTT (HTT < 0.59) and 439 human breast cancer samples expressing high levels of HTT (HTT > 0.59).

Kaplan-Meier analysis, Logrank test: $p = 0.0010$, Chi square = 10.86

Figure 4B

Data are from three independent experiments: si-control: 61 cells, si-HTT1: 95 cells, si-HTT2: 56 cells.

ANOVA $F[2,209] = 19.26$; $p < 0.0001$

Tukey's Post Hoc test:

si-control vs si-HTT1: $p < 0.0001$

si-control vs si-HTT2: $p < 0.0001$

si-HTT1 vs si-HTT2: $p = 0.8499$

Figure 4C

Data are from three independent experiments: sh-control: 48 cells, sh-HTT: 28 cells, sh-HTT+FLHTT: 33 cells

ANOVA $F[2,106] = 9.939$; $p = 0.0001$

Tukey's Post Hoc test:

sh-control vs sh-HTT: $p = 0.0011$

sh-control vs sh-HTT: $p = 0.6476$

sh-HTT vs sh-HTT+FLHTT: $p = 0.0002$

Figure 4D

Data are from three independent experiments: si-control: 51 fields, si-HTT1: 51 fields.

Unpaired t-test: $p < 0.0001$

Figure 4E

Data are from five independent experiments: si-control: 7 inserts, si-HTT1: 7 inserts.

Unpaired t-test: $p = 0.0131$

Figure 4G

Data are from one experiment: si-control: 11 mice, si-HTT1: 11 mice. A second experiment showed similar results.

Unpaired t-test: $p = 0.0050$

Figure 5A

Data are from 30 MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} mice, 14 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} mice and 13 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} mice.

Kaplan-Meier analysis, Logrank test: $p = 0.5948$, Chi square = 1.039

Figure 5B

Data are from 30 MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} mice, 14 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} mice and 12 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} mice.

5 weeks-old:

ANOVA $F[2,53] = 0.4587$; $p=0.6346$

6 weeks-old:

ANOVA $F[2,53] = 0.1986$; $p=0.8205$

7 weeks-old:

ANOVA $F[2,53] = 0.1927$; $p=0.8253$

8 weeks-old:

ANOVA $F[2,53] = 1.181$; $p=0.3148$

9 weeks-old:

ANOVA $F[2,53] = 2.038$; $p=0.1404$

10 weeks-old:

ANOVA $F[2,53] = 3.446$; $p=0.0392$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p=0.0303$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.6082$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.3874$

11 weeks-old:

ANOVA $F[2,53] = 2.934$; $p=0.0619$

12 weeks-old:

ANOVA $F[2,53] = 3.880$; $p=0.0268$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p=0.0199$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.7219$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.2458$

13 weeks-old:

ANOVA $F[2,53] = 4.388$; $p=0.0172$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p=0.0151$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.9646$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.0883$

14 weeks-old:

ANOVA $F[2,53] = 6.318$; $p=0.0035$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p=0.0023$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.4825$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.1438$

15 weeks-old:

ANOVA $F[2,53] = 8.048$; $p=0.0009$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p=0.0006$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.5710$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.0495$

16 weeks-old:

ANOVA $F[2,53] = 4.896$; $p=0.0112$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p=0.0121$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.9994$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.0430$

Figure 5C

Data are from 30 MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} mice, 14 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} mice and 13 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} mice.

ANOVA $F[2,54]=1.943$; $p=0.1531$

Figure 5D

Data are from 30 MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} mice, 14 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} mice and 13 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} mice.

ANOVA $F[2,54]=6.386$; $p=0.0032$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p=0.0036$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p>0.9999$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.0164$

Figure 5E

Data are from 30 MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} mice, 14 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} mice and 13 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} mice.

Size 0:

ANOVA $F[2,54] = 8.228$; $p=0.0008$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p=0.0034$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.5675$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.0012$

0 < Size < 0.5cm:

ANOVA $F[2,54] = 0.4523$; $p=0.6385$

0.5 < Size < 1cm:

ANOVA $F[2,54] = 4.869$; $p=0.0114$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p=0.0231$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.811$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.0187$

Size > 1cm:

ANOVA $F[2,54] = 8.908$; $p=0.0005$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p=0.0017$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.6496$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.0010$

Figure 5F

Data are from MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+}: 3 independent tumors, 8627 cells scored, MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: 3 independent tumors, 7813 cells scored and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: 3 independent tumors, 7183 cells scored.

ANOVA $F[2,6] = 0.6404$; $p=0.0465$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p=0.1661$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.5499$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p=0.0418$

Figure 5G

Data are from MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+}: 3 independent tumors, 4480 cells scored, MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: 3 independent tumors, 7611 cells scored and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: 3 independent tumors, 4672 cells scored.

ANOVA $F[2,7] = 1.718$; $p = 0.2471$

Figure 5H

Data are from three independent experiments. MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+}: 3 cell lines, 75 cells, MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: 3 cell lines, 70 cells, MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} mice: 3 cell lines, 74 cells.

ANOVA $F[2,216] = 23.88$; $p < 0.0001$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p < 0.0001$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p = 0.9884$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p < 0.0001$

Figure 5I

Data are from three independent experiments. MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+}: 3 cell lines, MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: 2 cell lines and MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: 2 cell lines.

Alive cells

ANOVA $F[2,8] = 6.582$; $p = 0.0204$

Tukey's Post Hoc test:

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A}: $p = 0.0171$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p = 0.6351$

MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} vs MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D}: $p = 0.1002$

Apoptotic cells

ANOVA $F[2,8] = 0.5575$; $p = 0.5934$

Necrotic cells

ANOVA $F[2,8] = 1.578$; $p = 0.2645$

Figure 7A

Data are from 15 human breast cancer samples expressing low levels of HTT and 15 human breast cancer samples expressing high levels of HTT.

HTT: Unpaired t-test, $p < 0.0001$

ZO1: Unpaired t-test, $p = 0.0021$

OCN: Unpaired t-test, $p = 0.7501$

CLDN1: Unpaired t-test, $p = 0.4322$

CLDN4: Unpaired t-test, $p = 0.3444$

Figure 7B

Data are from 30 human breast cancer samples.

Pearson correlation, $r = 0.6580$, $p < 0.0001$

Figure 7D

Left

Data are from 33 Luminal A, 35 luminal B, 31 HER2+ and 33 triple-negative human breast cancer samples.

Kruskal-Wallis, chi-square=12.81; $p = 0.0051$

Dunn's Post Hoc test:

Luminal A vs luminal B; $p = 0.3586$

Luminal A vs HER2+; $p = 0.0400$

Luminal A vs Triple-negative; $p = 0.0047$

Luminal B vs HER2+; $p > 0.9999$
 Luminal B vs Triple-negative; $p = 0.7630$
 HER2+ vs Triple-negative; $p > 0.9999$

Right

Data are from 33 Luminal A, 35 luminal B, 31 HER2+ and 33 triple-negative human breast cancer samples.

Kruskal-Wallis, chi-square=13.92; $p = 0.0049$

Dunn's Post Hoc test:

Luminal A vs luminal B; $p > 0.9999$

Luminal A vs HER2+; $p > 0.9999$

Luminal A vs Triple-negative; $p = 0.0039$

Luminal B vs HER2+; $p > 0.9999$

Luminal B vs Triple-negative; $p = 0.0156$

HER2+ vs Triple-negative; $p = 0.1087$

Figure S1B

Data are from 67 luminal, 34 HER2+ and 45 Triple-negative human breast cancer samples.

Kruskal-Wallis, chi-square=47.06; $p < 0.0001$

Dunn's Post Hoc test:

Luminal vs HER2+; $p = 0.0156$

Luminal vs Triple-negative; $p < 0.0001$

HER2+ vs Triple-negative; $p = 0.0038$

Figure S2B

Data are from 16 MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} mice, 6 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} mice and 7 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} mice.

ANOVA $F[2,26] = 0.02023$; $p = 0.9703$

Figure S2C

Data are from 16 MMTV-PyVT/*Hdh*^{+/+} mice, 6 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421A/S421A} mice and 7 MMTV-PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} mice.

ANOVA $F[2,26] = 0.08738$; $p = 0.9166$

Table S1

SBR Histological Grade

Data are from 57 Grade I, 227 Grade II and 156 Grade III human breast cancer samples.

ANOVA $F[2,437] = 10.76$; $p < 0.0001$

Tukey's Post Hoc test:

Grade I vs Grade II; $p = 0.7467$

Grade I vs Grade III; $p = 0.0452$

Grade II vs Grade III; $p < 0.0001$

Lymph node status

Data are from 117 Status 0, 234 Status 1-3 and 97 Status >3 human breast cancer samples.

ANOVA $F[2,445] = 0.28$; $p = 0.76$

Molecular subtypes

Data are from 286 Luminal, 54 Luminal/HER2+, 43 HER2+ and 66 Triple-negative human breast cancer samples.

ANOVA $F[3,445] = 19.22$; $p < 0.0001$

Tukey's Post Hoc test:

Luminal vs Luminal B/HER2+; $p = 0.1059$

Luminal vs HER2+; $p < 0.0001$

Luminal vs Triple-negative; $p < 0.0001$
 Luminal B/HER2+ vs HER2+; $p < 0.0001$
 Luminal B/HER2+ vs Triple-negative; $p = 0.0004$
 HER2+ vs Triple-negative; $p = 0.0266$

Table S2*SBR Histological Grade*

Data are from 80 Grade I, 131 Grade II and 241 Grade III human breast cancer samples.
 Kruskal-Wallis test, Chi-square=41.02; $p < 0.0001$

Holm's Post Hoc test:

Grade I vs Grade II; $p = 0.0244$
 Grade I vs Grade III; $p < 0.0001$
 Grade II vs Grade III; $p < 0.0001$

Lymph node status

Data are from 135 Status 0, 250 Status 1-3 and 65 Status >3 human breast cancer samples.
 Kruskal-Wallis test, Chi-square=4.17; $p = 0.1242$

Molecular subtypes

Data are from 133 Luminal A, 113 Luminal B, 14 Luminal B/HER2+, 76 HER2+ and 118 Triple-negative human breast cancer samples.

Kruskal-Wallis test, Chi-square=68.39; $p < 0.0001$

Holm's Post Hoc test:

Luminal A vs Luminal B; $p = 0.0135$
 Luminal A vs Luminal B/HER2+; $p = 0.6747$
 Luminal A vs HER2+; $p = 0.0003$
 Luminal A vs Triple-negative; $p < 0.0001$
 Luminal B vs Luminal B/HER2+; $p = 0.6747$
 Luminal B vs HER2+; $p = 0.3132$
 Luminal B vs Triple-negative; $p < 0.0001$
 Luminal B/HER2+ vs HER2+; $p = 0.3132$
 Luminal B/HER2+ vs Triple-negative; $p = 0.0046$
 HER2+ vs Triple-negative; $p = 0.0652$

REFERENCES

- Arboleda MJ, Lyons, JF, Kabbinar, FF, Bray, MR, Snow, BE, Ayala, R, Danino, M, Karlan, BY, Slamon, DJ 2003. Overexpression of AKT2/protein kinase B β leads to up-regulation of β 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* **63**: 196-206.
- Awadelkarim KD, Callens, C, Rosse, C, Susini, A, Vacher, S, Rouleau, E, Lidereau, R, Bieche, I 2012. Quantification of PKC family genes in sporadic breast cancer by qRT-PCR: evidence that PKC δ /lambda overexpression is an independent prognostic factor. *Int J Cancer* **131**: 2852-2862.
- Balda MS, Garrett, MD, Matter, K 2003. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* **160**: 423-432.
- Bernet A, Mazelin, L, Coissieux, MM, Gadot, N, Ackerman, SL, Scoazec, JY, Mehlen, P 2007. Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* **133**: 1840-1848.
- Bieche I, Onody, P, Laurendeau, I, Olivi, M, Vidaud, D, Lidereau, R, Vidaud, M 1999. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem* **45**: 1148-1156.
- Bieche I, Parfait, B, Laurendeau, I, Girault, I, Vidaud, M, Lidereau, R 2001. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* **20**: 8109-8115.
- Cancer Genome Atlas N 2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**: 61-70.
- Cascione L, Gasparini, P, Lovat, F, Carasi, S, Pulvirenti, A, Ferro, A, Alder, H, He, G, Vecchione, A, Croce, CM, et al. 2013. Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. *PLoS One* **8**: e55910.
- Caviston JP, Holzbaur, EL 2009. Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. *Trends in cell biology* **19**: 147-155.
- Caviston JP, Ross, JL, Antony, SM, Tokito, M, Holzbaur, EL 2007. Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10045-10050.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., et al. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery* **2**, 401-40
- Chen J, Xiao, L, Rao, JN, Zou, T, Liu, L, Bellavance, E, Gorospe, M, Wang, JY 2008. JunD represses transcription and translation of the tight junction protein zona occludens-1 modulating intestinal epithelial barrier function. *Molecular biology of the cell* **19**: 3701-3712.
- Chomczynski P, Sacchi, N 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.
- Colin E, Zala, D, Liot, G, Rangone, H, Borrell-Pages, M, Li, XJ, Saudou, F, Humbert, S 2008. Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J* **27**: 2124-2134.
- Dangles-Marie V, Pocard, M, Richon, S, Weiswald, LB, Assayag, F, Saulnier, P, Judde, JG, Janneau, JL, Auger, N, Validire, P, et al. 2007. Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: comparison of success rate and cell line features. *Cancer Res* **67**: 398-407.

- Dillon RL, Marcotte, R, Hennessy, BT, Woodgett, JR, Mills, GB, Muller, WJ 2009. Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res* **69**: 5057-5064.
- Dragatsis I, Efstratiadis, A, Zeitlin, S 1998. Mouse mutant embryos lacking huntingtin are rescued from lethality by wild-type extraembryonic tissues. *Development* **125**: 1529-1539.
- Dragatsis I, Levine, MS, Zeitlin, S 2000. Inactivation of *hdh* in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* **26**: 300-306.
- Drouet V, Perrin, V, Hassig, R, Dufour, N, Auregan, G, Alves, S, Bonvento, G, Brouillet, E, Luthi-Carter, R, Hantraye, P, et al. 2009. Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Ann Neurol* **65**: 276-285.
- Ducker CE, Stettler, EM, French, KJ, Upson, JJ, Smith, CD 2004. Huntingtin interacting protein 14 is an oncogenic human protein: palmitoyl acyltransferase. *Oncogene* **23**: 9230-9237.
- Elias S, Thion, MS, Yu, H, Sousa, CM, Lasgi, C, Morin, X, Humbert, S 2014. Huntingtin regulates mammary stem cell division and differentiation. *Stem Cell Reports* **2**: 491-506.
- Feng Z, Jin, S, Zupnick, A, Hoh, J, de Stanchina, E, Lowe, S, Prives, C, Levine, AJ 2006. p53 tumor suppressor protein regulates the levels of huntingtin gene expression. *Oncogene* **25**: 1-7.
- Fitamant J, Guenebeaud, C, Coissieux, MM, Guix, C, Treilleux, I, Scoazec, JY, Bachelot, T, Bernet, A, Mehlen, P 2008. Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 4850-4855.
- Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., et al. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* **6**, pl1.
- Gauthier LR, Charrin, BC, Borrell-Pages, M, Dompierre, JP, Rangone, H, Cordelieres, FP, De Mey, J, MacDonald, ME, Lessmann, V, Humbert, S, et al. 2004. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* **118**: 127-138.
- Godin JD, Colombo, K, Molina-Calavita, M, Keryer, G, Zala, D, Charrin, BC, Dietrich, P, Volvert, ML, Guillemot, F, Dragatsis, I, et al. 2010a. Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* **67**: 392-406.
- Godin JD, Poizat, G, Hickey, MA, Maschat, F, Humbert, S 2010b. Mutant huntingtin-impaired degradation of beta-catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease. *EMBO J* **29**: 2433-2445.
- Guy CT, Cardiff, RD, Muller, WJ 1992. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol* **12**: 954-961.
- Hoover KB, Liao, SY, Bryant, PJ 1998. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol* **153**: 1767-1773.
- Humbert S, Bryson, EA, Cordelieres, FP, Connors, NC, Datta, SR, Finkbeiner, S, Greenberg, ME, Saudou, F 2002. The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* **2**: 831-837.
- Hutchinson JN, Jin, J, Cardiff, RD, Woodgett, JR, Muller, WJ 2004. Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res* **64**: 3171-3178.

Irie HY, Pearline, RV, Grueneberg, D, Hsia, M, Ravichandran, P, Kothari, N, Natesan, S, Brugge, JS 2005. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* **171**: 1023-1034.

Itoh M, Bissell, MJ 2003. The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **8**: 449-462.

Knights AJ, Funnell, AP, Crossley, M, Pearson, RC 2012. Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. *Trends in cancer research* **8**: 61-69.

Lo Sardo V, Zuccato, C, Gaudenzi, G, Vitali, B, Ramos, C, Tartari, M, Myre, MA, Walker, JA, Pistocchi, A, Conti, L, et al. 2012. An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin. *Nat Neurosci* **15**: 713-721.

Lumsden AL, Henshall, TL, Dayan, S, Lardelli, MT, Richards, RI 2007. Huntingtin-deficient zebrafish exhibit defects in iron utilization and development. *Hum Mol Genet* **16**: 1905-1920.

Maroulakou IG, Oemler, W, Naber, SP, Tschlis, PN 2007. Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res* **67**: 167-177.

Martin TA, Jiang, WG 2009. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochimica et biophysica acta* **1788**: 872-891.

Martin TA, Watkins, G, Mansel, RE, Jiang, WG 2004. Loss of tight junction plaque molecules in breast cancer tissues is associated with a poor prognosis in patients with breast cancer. *Eur J Cancer* **40**: 2717-2725.

McCaffrey LM, Macara, IG 2009. The Par3/aPKC interaction is essential for end bud remodeling and progenitor differentiation during mammary gland morphogenesis. *Genes & development* **23**: 1450-1460.

Moreira Sousa C, Humbert, S 2013. Huntingtin: Here, There, Everywhere! *Journal of Huntington's disease* **2**: 395-403.

Moreira Sousa C, McGuire, JR, Thion, MS, Gentien, D, de la Grange, P, Tezenas du Montcel, S, Vincent-Salomon, A, Durr, A, Humbert, S 2013. The Huntington disease protein accelerates breast tumour development and metastasis through ErbB2/HER2 signalling. *EMBO Mol Med* **5**: 309-325.

Nagaoka K, Udagawa, T, Richter, JD 2012. CPEB-mediated ZO-1 mRNA localization is required for epithelial tight-junction assembly and cell polarity. *Nature communications* **3**: 675.

Pardo R, Colin, E, Regulier, E, Aebischer, P, Deglon, N, Humbert, S, Saudou, F 2006. Inhibition of calcineurin by FK506 protects against polyglutamine-huntingtin toxicity through an increase of huntingtin phosphorylation at S421. *J Neurosci* **26**: 1635-1645.

Pardo R, Molina-Calavita, M, Poizat, G, Keryer, G, Humbert, S, Saudou, F 2010. pARIS-htt: an optimised expression platform to study huntingtin reveals functional domains required for vesicular trafficking. *Mol Brain* **3**: 17.

Petitjean A, Mathe, E, Kato, S, Ishioka, C, Tavtigian, SV, Hainaut, P, Olivier, M 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* **28**: 622-629.

Prat A, Cheang, MC, Martin, M, Parker, JS, Carrasco, E, Caballero, R, Tyldesley, S, Gelmon, K, Bernard, PS, Nielsen, TO, et al. 2013. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol* **31**: 203-209.

Rangone H, Poizat, G, Troncoso, J, Ross, CA, MacDonald, ME, Saudou, F, Humbert, S 2004. The serum- and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin. *Eur J Neurosci* **19**: 273-279.

Rao DS, Hyun, TS, Kumar, PD, Mizukami, IF, Rubin, MA, Lucas, PC, Sanda, MG, Ross, TS 2002. Huntingtin-interacting protein 1 is overexpressed in prostate and colon cancer and is critical for cellular survival. *J Clin Invest* **110**: 351-360.

Runkle EA, Mu, D 2013. Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis. *Cancer letters* **337**: 41-48.

Sahoo S, Brickley, DR, Kocherginsky, M, Conzen, SD 2005. Coordinate expression of the PI3-kinase downstream effectors serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK-1) and Akt-1 in human breast cancer. *Eur J Cancer* **41**: 2754-2759.

Shirasaki DI, Greiner, ER, Al-Ramahi, I, Gray, M, Boontheung, P, Geschwind, DH, Botas, J, Coppola, G, Horvath, S, Loo, JA, et al. 2012. Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron* **75**: 41-57.

Steffan JS, Kazantsev, A, Spasic-Boskovic, O, Greenwald, M, Zhu, YZ, Gohler, H, Wanker, EE, Bates, GP, Housman, DE, Thompson, LM 2000. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6763-6768.

Tang J, Ahmad, A, Sarkar, FH 2012. The Role of MicroRNAs in Breast Cancer Migration, Invasion and Metastasis. *Int J Mol Sci* **13**: 13414-13437.

Tokes AM, Szasz, AM, Juhasz, E, Schaff, Z, Harsanyi, L, Molnar, IA, Baranyai, Z, Besznyak, I, Jr., Zarand, A, Salamon, F, et al. 2012. Expression of tight junction molecules in breast carcinomas analysed by array PCR and immunohistochemistry. *Pathol Oncol Res* **18**: 593-606.

Volinia S, Galasso, M, Sana, ME, Wise, TF, Palatini, J, Huebner, K, Croce, CM 2012. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 3024-3029.

Wolff AC, Hammond, ME, Schwartz, JN, Hagerty, KL, Allred, DC, Cote, RJ, Dowsett, M, Fitzgibbons, PL, Hanna, WM, Langer, A, et al. 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* **25**: 118-145.

Xue B, Krishnamurthy, K, Allred, DC, Muthuswamy, SK 2013. Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell-cell cohesion. *Nature cell biology* **15**: 189-200.

Yoeli-Lerner M, Yiu, GK, Rabinovitz, I, Erhardt, P, Jauliac, S, Toker, A 2005. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* **20**: 539-550.

Zhu L, Song, X, Tang, J, Wu, J, Ma, R, Cao, H, Ji, M, Jing, C, Wang, Z 2013. Huntingtin-associated protein 1: a potential biomarker of breast cancer. *Oncol Rep* **29**: 1881-1887.

Zuccato C, Tartari, M, Crotti, A, Goffredo, D, Valenza, M, Conti, L, Cataudella, T, Leavitt, BR, Hayden, MR, Timmusk, T, et al. 2003. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* **35**: 76-83.

Article 2. Le polymorphisme CAG de la *HTT* sauvage dans le cancer du sein

“ CAG repeat size in *Huntingtin* alleles predicts cancer prognosis ”

Morgane S. Thion, Sophie Tézenas du Montcel, Jean-Louis Golmard, Sophie Vacher, Laure Barjhoux, Valérie Sornin, Cécile Cazeneuve, Ivan Bièche, Olga Sinilnikova and Dominique Stoppa-Lyonnet for GEMO, Alexandra Durr and Sandrine Humbert

Au cours d’une seconde étude, nous nous sommes demandé si la longueur de répétition CAG dans un contexte non pathologique (<36 CAG) présente dans la *HTT* pouvait être liée aux risques de cancer ainsi qu’à leurs progressions. Deux études ont suggéré une incidence moindre du cancer parmi les individus atteints de la MH ; cependant aucune étude ne s’est intéressée aux associations entre la longueur de la répétition CAG non pathologique et les caractéristiques cliniques des cancers du sein. Nous avons donc caractérisé, en collaboration avec des médecins-chercheurs, l’influence du polymorphisme de la répétition CAG présente dans la *HTT* sauvage sur le risque des cancers du sein et leurs issues cliniques.

La longueur de l’expansion CAG de la *HTT* a été analysée dans deux cohortes d’individus. Une première cohorte était constituée de femmes porteuses d’une mutation pour *BRCA1* (n=1608) ou pour *BRCA2* (n=799), deux gènes connus pour leur implication dans les cancers du sein et de l’ovaire héréditaires. La seconde cohorte était composée des femmes atteintes de cancers du sein d’origine sporadique sans histoires familiales de cancers connues (n=431). Nous nous sommes intéressés séparément à la longueur de chaque allèle ; l’allèle long et l’allèle court (lorsque les individus étaient hétérozygotes pour le nombre de répétitions), mais aussi aux allèles intermédiaires (≥27 CAG).

La fréquence de distribution de la longueur du CAG de la *HTT* était comparable à celle qui est actuellement décrite dans la littérature avec une moyenne à 18 répétitions. Nous avons observé 6.13% des individus qui portaient une répétition ≥27 (allèle intermédiaire).

Étant donné la taille des cohortes et la prévalence estimée de la MH (4 à 8 pour 100 000), nous ne nous attendions pas à la présence de répétitions >35. De manière très surprenante, dans l’ensemble des deux cohortes (n=2838), nous avons observé la présence de cinq individus porteurs d’une répétition supérieure à 35 CAG (1:568). Ces répétitions se situent entre 36 et 38 CAG pour lesquelles une pénétrance incomplète de la MH est décrite.

Parmi les femmes porteuses de mutations *BRCA1* ou *BRCA2*, une grande majorité a développé des cancers du sein et/ou de l'ovaire. Cette population nous a donc permis d'évaluer si le risque de développer un cancer du sein variait en fonction de la longueur de la répétition. Ainsi, nous avons observé que plus l'allèle de la *HTT* contenait de CAG, plus les femmes porteuses de la mutation *BRCA2* avaient un risque moindre de développer un cancer de l'ovaire.

Parmi les femmes ayant développé un cancer, nous avons étudié le lien entre longueur du CAG et l'âge au diagnostic. L'âge moyen au diagnostic des cancers du sein chez les porteuses de la mutation *BRCA1* et *BRCA2* est respectivement de $41,0 \pm 9,5$ et $43,3 \pm 10,1$ années. Lorsque cet allèle est supérieur à 27 répétitions, les femmes avec une mutation *BRCA1* développent un cancer du sein 2,4 années plus précocement que les femmes porteuses d'une répétition CAG de la *HTT* inférieure à 27 répétitions ($p=0,02$). Aucune association entre la longueur de la répétition et le risque de développer des cancers des ovaires ou encore l'âge au diagnostic n'a été observée.

Dans la seconde cohorte de femmes atteintes d'un cancer du sein apparemment d'origine sporadique, nous n'avons pu corrélér ni la longueur des répétitions CAG l'allèle court ni celui de l'allèle long de la *HTT* avec aucun des paramètres clinicopathologiques étudiés (âge au diagnostic, taille tumorale, grade SBR, statut des ganglions lymphatiques, expression des RH et RO et surexpression/amplification de HER2). En conséquence, il n'existe pas d'association entre longueur de la répétition CAG et les différents sous-types moléculaires du cancer du sein.

Parmi ces 431 individus, 160 ont développé des métastases (37%). Nous avons donc étudié le lien entre la survie (temps depuis la chirurgie jusqu'au développement de métastases ou jusqu'au dernier rendez-vous médical) et la longueur de la répétition CAG en utilisant des modèles à risques proportionnels de Cox univariés et multivariés. Alors qu'il n'y avait aucun lien entre cette dernière et le développement de métastases dans la population entière, spécifiquement dans le sous-type HER2, pour dix répétitions supplémentaires de CAG, le risque relatif de développer des métastases est de 11,10 (95% IC 2,09-58,64 ; $p=0,0046$). Dans ce même modèle, l'envahissement des ganglions lymphatiques est aussi associé à une augmentation du risque relatif ; cependant dans le modèle multivarié, seule la longueur de la répétition est prédictive de l'apparition des métastases après ajustement sur les ganglions lymphatiques.

Ainsi, nous avons pu montrer que même dans une gamme de répétition non pathologique pour la MH, la longueur de la répétition de polyglutamines présente dans la *HTT* pouvait protéger contre les risques de développer des cancers de l'ovaire au sein d'une cohorte d'individus porteurs de mutations *BRCA1/2*. Il apparaît que lorsque le cancer se développe, la longueur de la répétition

CAG de la *HTT* est associée à la sévérité des cancers. Lorsqu'un cancer du sein se développe chez les porteuses de mutation *BRCA1*, il est diagnostiqué 2,4 années plus tôt chez les femmes avec un nombre de répétition ≥ 27 . Spécifiquement dans le type HER2, la longueur du CAG est un facteur prédictif indépendant de l'apparition des métastases. D'autre part, la forte et surprenante incidence des individus avec une répétition ≥ 36 suggère que la fréquence des porteurs de mutations situés entre 36 et 39 est largement sous-estimée (plus de dix fois).

CAG repeat size in *Huntingtin* alleles predicts cancer prognosis

Morgane Sonia Thion^{1,2,3,4}, Sophie Tézenas du Montcel^{5,6,7}, Jean-Louis Golmard⁵, Sophie Vacher¹, Laure Barjhoux⁸, Valérie Sornin⁸, Cécile Cazeneuve^{9,10}, Ivan Bièche^{1,11}, Olga Sinilnikova^{12,13} and Dominique Stoppa-Lyonnet^{1,13,14} for GEMO¹³, Alexandra Durr^{9,10} and Sandrine Humbert^{1,2,3}

¹Institut Curie, Paris, France

²CNRS UMR 3306, Orsay, France

³INSERM U1005, Orsay, France

⁴University Paris Sud 11, Orsay, France

⁵Department of Biostatistics and Medical Informatics, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris

⁶Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, F-75013, Paris, France

⁷INSERM, UMR_S 1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, F-75013, Paris, France

⁸INSERM U1052, CNRS UMR5286, Université Lyon 1, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

⁹Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, INSERM U975, CNRS UMR7225, UPMC Paris VI UMR S975, Paris, France

¹⁰Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Fédération de Génétique, Pitié-Salpêtrière University Hospital, Paris, France

¹¹University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France

¹²Unité Mixte de Génétique Constitutionnelle des Cancers Fréquents, Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France

¹³GEMO (Gene MOdifyer study of the Cancer Genetics Network “Groupe Génétique et Cancer”, UNICANCER, France)

¹⁴Department of Tumour Biology, INSERM U830, Paris, France

To whom correspondence should be addressed:

Alexandra Durr, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Paris, France

E-mail: alexandra.durr@icm-institute.org

Tel : +33 1 57 27 46 82

and

Sandrine Humbert, Institut Curie, CNRS UMR 3306, INSERM U1005

Centre Universitaire, Orsay, France

E-mail: sandrine.humbert@curie.fr

Tel : +33 1 69 86 30 69

SUMMARY

Background The abnormal expansion of a CAG tract ≥ 36 in the *Huntingtin* gene (*HTT*) leads to Huntington disease (HD). We investigated whether non-HD pathological *HTT* CAG repeat sizes are associated with cancer risk and outcome.

Methods Data from 2407 women carrying *BRCA1* or *BRCA2* mutations and 431 patients with breast cancer but without a familial history were analyzed. Genetic testing was performed to determine the size of the CAG expansion in both *HTT* alleles. We investigated the association of *HTT* CAG tract size with *BRCA1* and *BRCA2* breast and ovarian cancer risks, and age at cancer diagnosis. In patients with sporadic breast cancer, we estimated the influence of CAG size on clinicopathological variables and the progression of metastasis.

Findings The proportion of individuals carrying a pathological expansion ≥ 36 was surprisingly high, ranging between 0.17% and 0.23%. The length of the *HTT* CAG tract was negatively correlated with ovarian cancer risk in 779 carriers of a *BRCA2* mutation in single (HR 0.35; 95%CI: 0.14-0.87; $p=0.0245$) and competing analyses (HR 0.24; 95%CI: 0.06-0.92; $p=0.037$). Among carriers of *BRCA1* mutations, the onset of breast cancer occurred 2.4 years earlier in individuals with alleles ≥ 27 repeats in *HTT* than in those with a CAG tract below 27 repeats ($p=0.0235$). In patients with HER2 breast cancer of sporadic origin, the risk of metastasis increased by a factor of 11.10 (univariate analysis: 95%CI: 2.09-58.64; $p=0.0046$) *per* ten additional CAG repeats in *HTT*.

Interpretation The high prevalence of *HTT* mutations ≥ 36 suggests that the HD mutation is ten times more frequent than previously reported. Our data suggest that a high number of non-HD pathological CAG repeats in *HTT* protects against cancer development, although it may also enhance its severity.

INTRODUCTION

The *HTT* gene has been mostly studied as mutated in the context of Huntington's disease (HD). Psychiatric, cognitive and motor disturbances are characteristic of HD and generally emerge during mid-adulthood. *HTT* carries a polymorphic trinucleotide repeat of CAG in exon 1, encoding a stretch of glutamine in the huntingtin protein (HTT)(Group, 1993). In the general population, the CAG expansion ranges from 9 to 35 repeats with an average between 17 and 20 repeats. An expansion exceeding 35 results in HD. Rare carriers of 36 to 39 CAG repeats show a lower penetrance and later onset than carriers with 40 or more CAG repeats(Andrew et al., 1993b; Snell et al., 1993; Rubinsztein et al., 1996). Age at symptomatic disease is negatively correlated with the CAG tract size. Intermediate alleles between 27 and 35 CAG repeats were originally thought to have no clinical implications. However, this view has been recently challenged(Semaka and Hayden, 2013) and evidence shows that patients with an intermediate number of repeats display some aspects of the disease(Killoran et al., 2013).

Two studies showed that the risk of cancer in patients with HD is lower than in aged-matched controls(Sorensen et al., 1999; Ji et al., 2012). Although the incidence of cancer is low among HD patients, its progression may be faster. Indeed, mutant HTT accelerates the progression of breast tumors and the development of metastasis in mouse models of breast cancer; therefore, mutant HTT may be an aggravating factor when cancer is already established(Moreira Sousa et al., 2013). However, it is unknown whether the size of the non-HD pathological CAG tract (<36 repeats) influences breast cancer risk in the general population.

Most cases of breast cancer are sporadic and involve a multitude of risk factors(Kelsey et al., 1993). A small proportion of breast cancer is hereditary and can be caused by one of several transmitted mutations, including germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* which confer a high risk of breast and ovarian cancer(Narod and Foulkes, 2004). In this report, we investigated the association between the length of *HTT* CAG repeat and cancer risk in female carriers of *BRCA1* and *BRCA2* mutations, and cancer prognosis in patients with sporadic breast cancer.

RESULTS

We investigated the length and the distribution of the *HTT* CAG expansion in cohorts 1 and 2 (figure 1 and table 1). The distribution of the *HTT* CAG repeat number in both cohorts was comparable with that described in the general worldwide population (Lee et al., 2012b) with a mean number of repetitions of 20 for the long allele and 17 for the short allele.

Among the 2838 individuals in the two cohorts, five patients carried a pathological CAG expansion of 36 repeats or more in one allele of the *HTT* gene (table 1). The overall prevalence of patients carrying a *HTT* allele with a CAG repeat equal or over 36 was therefore surprisingly high at around 1:568 (0.18%); higher than previous estimates (0.008% to 0.012% reported in (Tassicker et al., 2009; Morrison et al., 2011; Evans et al., 2013)).

We then analyzed the influence of *HTT* CAG tract size on breast and ovarian cancer risks in cohort 1. In *BRCA1* mutation carriers, *HTT* CAG repeat length was not associated with breast or ovarian cancer risk, regardless of whether analyses were performed separately or simultaneously for these cancers (table 2). We obtained similar results for breast cancer in *BRCA2* mutation carriers. However, a large number of CAG repeats in *HTT* protected *BRCA2* mutation carriers against ovarian cancer in single (long allele: HR 0.35 95% CI 0.14-0.87; $p=0.0245$) and competing analyses (short allele: HR 0.24 95% CI 0.06-0.92; $p=0.037$).

We investigated whether *HTT* CAG length was associated with age at onset among *BRCA1* or *BRCA2* carriers who developed a cancer. *BRCA1* carriers developed a breast cancer on average at 41.0 ± 9.5 years and *BRCA2* at 43.3 ± 10.1 years. Among *BRCA1* carriers, patients with a CAG repeat number ≥ 27 in the *HTT* long allele developed cancer 2.43 ± 1.06 years before patients with a *HTT* CAG length under 27 ($p=0.0235$; table 3). In the *BRCA2* population, we observed the same trend although the relationship was not significant ($p=0.0900$; table 3). These effects were specific to breast cancer because we did not observe an association between *HTT* CAG length and the age of ovarian cancer onset in *BRCA1* or *BRCA2* carriers. We found similar results when the four patients carrying a HD pathological CAG repeat ≥ 36 were excluded (data not shown).

In cohort 2, there were no significant associations between the size of the *HTT* CAG expansion and any of the studied clinicopathological variables (table 4). Results obtained in patients carrying a ≥ 27 CAG expansion were comparable to those obtained for patients with <27 CAG repeats (supplemental table 2).

We then analyzed patient MFS in the whole population of cohort 2 (supplemental table 3) as well as in each breast cancer molecular subtype (table 5) with univariate and multivariate Cox proportional hazards models. At last follow-up, 160 patients had developed metastasis (37%) and classical prognostic factors influenced MFS progression (table 5; supplemental table 3). In the whole population, the CAG size in the *HTT* short allele emerged as a predictor of MFS with tumor size, SBR grade II and III and lymph node invasion after multivariate analysis (HR 2.19, 95% CI 1.01-4.73; $p=0.0469$; supplemental table 3). In the HER2 subtype, univariate analysis revealed a positive

correlation between the length of CAG in the *HTT* long allele metastasis risk, which increased by a factor of 11.1 for every ten additional CAG repeats (95% CI 2.09-58.64; $p=0.0046$; table 5). Furthermore, the length of the CAG repeat in the *HTT* long allele was the only prognostic factor of MFS after adjustment for lymph node invasion by multivariate analysis.

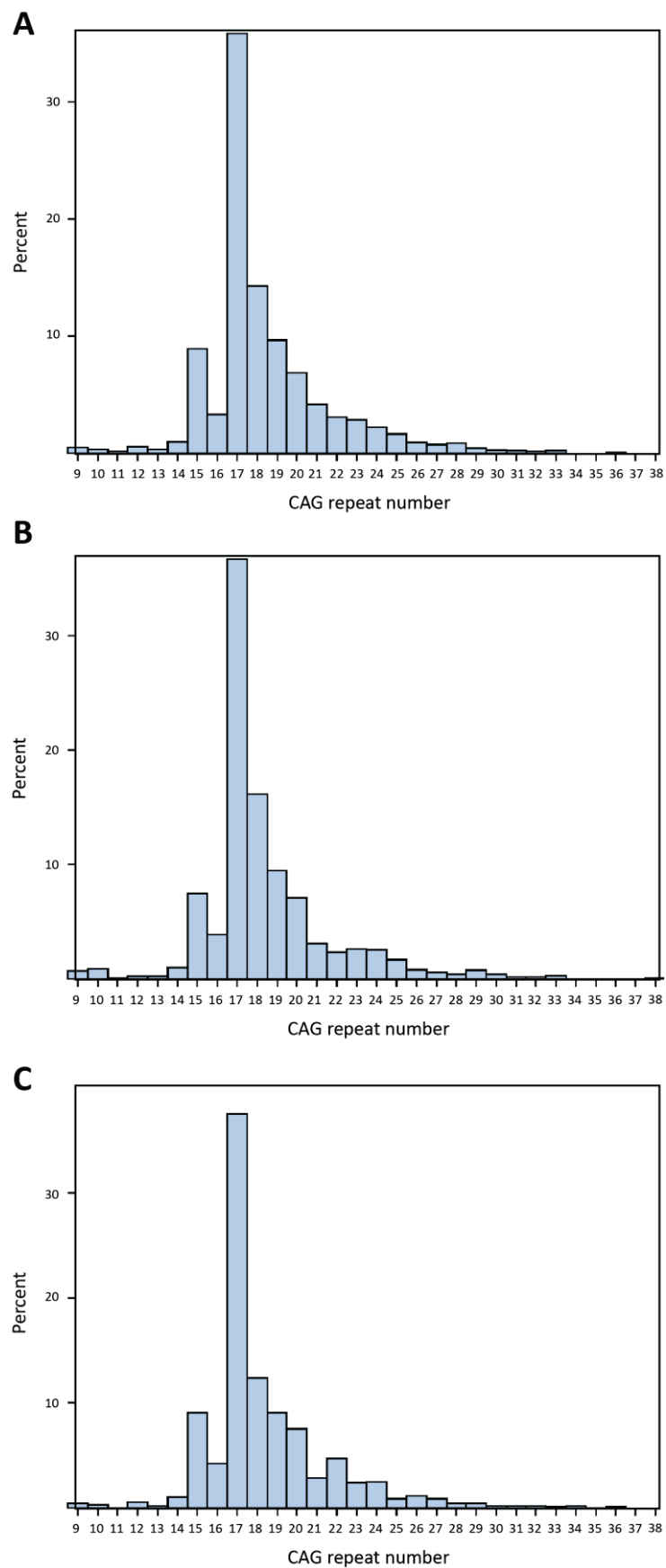


Figure 1: Huntingtin allele frequency in A, BRCA1 mutation carriers; B, BRCA2 mutation carriers; C, sporadic breast cancers

	<i>BRCA1</i> -mutation (n=1608)		<i>BRCA2</i> -mutation (n=799)		Sporadic breast cancer
BREAST CANCER	Unaffected (n=677)	Affected (n=931)	Unaffected (n=238)	Affected (n=561)	Affected (n=431)
Age ^a	42.7 ± 13.0	41.0 ± 9.5	43.4 ± 14.1	43.3 ± 10.1	61.9 ± 11.9
CAG repeats ^b					
Long allele	20 ± 3 [15-33]	20 ± 4 [14-36]	20 ± 4 [10-38]	20 ± 4 [15-33]	20 ± 3 [15-36]
Short allele	17 ± 2 [9-28]	17 ± 2 [9-28]	17 ± 2 [9-23]	17 ± 2 [9-25]	17 ± 2 [9-25]
Number of patients (%)					
One allele ≥ 36	0 (0.0%)	3 (0.3%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)	1 (0.2%)
At least, one allele ≥ 27	36 (5.3%)	65 (7.0%)	14 (5.9%)	33 (5.9%)	26 (6.0%)
OVARIAN CANCER	Unaffected (n=1277)	Affected (n=331)	Unaffected (n=737)	Affected (n=62)	-
Age ^a	43.9 ± 12.2	50.9 ± 8.9	47.3 ± 12.8	57.7 ± 8.7	-
CAG repeats ^b					
Long allele	20 ± 4 [14-36]	20 ± 3 [16-36]	20 ± 4 [15-38]	19 ± 3 [10-31]	-
Short allele	17 ± 2 [9-28]	17 ± 2 [9-28]	17 ± 2 [9-25]	16 ± 2 [9-20]	-
Number of patients (%)					
One allele ≥ 36	2 (0.2%)	1 (0.3%)	1 (0.1%)	0 (0.0%)	-
At least, one allele ≥ 27	84 (6.6%)	17 (5.1%)	45 (6.1%)	2 (3.2%)	-
^a Data are mean ± standard deviation (years). Mean age at last observation for unaffected patients or at age of cancer diagnosis for cancer patients					
^b Data are mean ± standard deviation [minimum-maximum]					

Table 1: *HTT* CAG tract length by disease status and *BRCA1/2* mutation

	Short allele		Long allele		At least, one allele ≥ 27	
	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p
BRCA1 Breast cancer						
single	1.11 (0.77-1.60)	0.5765	1.05 (0.85-1.30)	0.6587	1.30 (0.96-1.75)	0.0850
competing	1.15 (0.79-1.67)	0.4751	1.03 (0.83-1.29)	0.7650	1.25 (0.92-1.70)	0.1569
BRCA2 Breast cancer						
single	0.94 (0.59-1.50)	0.8003	1.15 (0.88-1.51)	0.3119	1.10 (0.73-1.66)	0.6441
competing	0.87 (0.54-1.39)	0.5490	1.09 (0.82-1.44)	0.5403	1.09 (0.71-1.65)	0.6918
BRCA1 Ovarian cancer						
single	1.43 (0.80-2.56)	0.2306	1.13 (0.81-1.58)	0.4683	0.78 (0.46-1.33)	0.3657
competing	1.43 (0.69-2.98)	0.3302	1.05 (0.69-1.62)	0.8080	0.64 (0.30-1.39)	0.2624
BRCA2 Ovarian cancer						
single	0.35 (0.11-1.08)	0.0677	0.35 (0.14-0.87)	0.0245*	0.60 (0.14-2.58)	0.4955
competing	0.24 (0.06-0.92)	0.0370*	0.40 (0.15-1.10)	0.0759	0.84 (0.18-3.84)	0.8274
Data are Hazard Ratio per ten additional repeat for short, long and average of both alleles; CI, confidence Interval						

Table 2: Influence of *HTT* CAG expansion on *BRCA1* and *BRCA2* breast and ovarian cancer risks in single and competing risk analysis (cohort 1)

<i>HTT</i> alleles	Breast Cancer		Ovarian cancer	
	<i>BRCA1</i> -mutation (n=931)	<i>BRCA2</i> -mutation (n=561)	<i>BRCA1</i> -mutation (n=332)	<i>BRCA2</i> -mutation (n=64)
Short allele	-1.20 ± 1.80 0.5068	-0.11 ± 1.95 0.9539	-0.61 ± 1.52 0.6889	-1.57 ± 2.20 0.4749
Long allele	-0.84 ± 0.88 0.3425	-1.70 ± 1.15 0.1427	+0.01 ± 0.91 0.9940	-2.11 ± 1.18 0.0750
At least, one allele ≥ 27	-2.43 ± 1.06 0.0235*	-2.70 ± 1.58 0.0900	+0.67 ± 1.31 0.6093	-2.15 ± 1.58 0.1765
Data are Estimate ± standard error per ten additional repeat or if at least one allele over 27 repeats (ANOVA with sandwich estimator taking into account family effect); p-value				

Table 3: Influence of *HTT* CAG expansion on *BRCA1* and *BRCA2* breast and ovarian cancer age of diagnosis among affected (cohort 1)

Characteristics	HTT short allele		HTT long allele	
	CAG length	P	CAG length	P
Total	16.87 ± 1.98	-	19.9 ± 3.54	-
Age (years)	-	r=-0.02 p=0.7567	-	r=-0.05 p=0.3422
Macroscopic tumor size				
≤ 25 mm	16.89 ± 2.08	0.9784	20.13 ± 3.70	0.1978
>25 mm	16.89 ± 1.90		19.69 ± 3.38	
SBR histological grade ^a				
I	17.27 ± 2.05	0.1052	20.94 ± 4.51	0.0670
II	16.89 ± 1.98		19.77 ± 3.58	
III	16.63 ± 1.93		19.72 ± 3.07	
Lymph node status				
0	17.02 ± 1.86	0.6928	19.73 ± 3.49	0.6653
1-3	16.84 ± 1.80		19.90 ± 3.41	
>3	16.82 ± 2.50		20.18 ± 3.93	
ER status				
Negative	16.81 ± 2.07	0.6937	19.73 ± 3.02	0.5053
Positive	16.90 ± 1.95		19.97 ± 3.70	
PR status				
Negative	16.87 ± 1.93	0.9679	19.70 ± 3.21	0.2805
Positive	16.88 ± 2.02		20.06 ± 3.76	
HER2 status				
Negative	16.94 ± 1.98	0.1826	19.98 ± 3.56	0.4208
Positive	16.63 ± 1.97		19.64 ± 3.46	
Molecular subtypes				
Luminal (HR+, HER2-)	16.91 ± 1.98	0.4781	19.91 ± 3.62	0.3896
Luminal B/HER2 (HR+, HER2)	16.74 ± 1.87		20.10 ± 4.07	
HER2 (HR-, HER2)	16.50 ± 2.10		19.10 ± 2.49	
TPN (HR-, HER2-)	17.08 ± 1.99		20.27 ± 3.32	
Data are mean ± standard deviation				
^a Scarff Bloom Richardson classification				

Table 4: Characteristics of the 431 sporadic breast cancers relative to CAG length of *HTT* short, long and average of both alleles (cohort 2)

Characteristics	Cases (n)	Hazard Ratio (95% CI)	P
Luminal (HR+ HER2-)	275 (63.8%)		
Age (years)	275 (100%)	0.99 (0.98-1.01)	0.4639
Macroscopic tumor size	269 (97.8%)		
≤ 25 mm	138 (51.3%)	1	<0.0001***
>25 mm	131 (48.7%)	2.78 (1.81-4.27)	
SBR histological grade ^a	273 (99.3%)		
I	46 (16.9%)	1	0.0089**
II	171 (62.6%)	3.07 (1.33-7.12)	
III	56 (20.5%)	5.05 (2.10-12.15)	
Lymph node status	275 (100%)		
0	62 (22.6%)	1	0.6890
1-3	154 (56.0%)	1.12 (0.65-1.91)	
>3	59 (21.4%)	2.48 (1.40-4.40)	
HTT short allele CAG length	275 (100%)	1.67 (0.61-4.56)	0.3129
HTT long allele CAG length	275 (100%)	0.55 (0.29-1.05)	0.0698
At least, one HTT allele ≥ 27CAG	17 (3.9%)	0.30 (0.08-1.23)	0.0949
Luminal B/HER2 (HR+ HER2)	50 (11.6%)		
Age (years)	50 (100%)	1.00 (0.97-1.04)	0.8382
Macroscopic tumor size	49 (98.0%)		
≤ 25 mm	30 (61.2%)	1	0.1342
>25 mm	19 (38.8%)	2.04 (0.80-5.18)	
SBR histological grade ^a	49 (98.0%)		
I	6 (12.2%)	1	0.6899
II	24 (49.0%)	1.36 (0.30-6.17)	
III	19 (38.8%)	0.72 (0.14-3.69)	
Lymph node status	50 (100%)		
0	16 (32.0%)	1	0.1003
1-3	23 (46.0%)	3.59 (0.78-16.46)	
>3	11 (22.0%)	6.21 (1.25-30.89)	
HTT short allele CAG length	50 (100%)	13.83 (0.70-273.29)	0.0844
HTT long allele CAG length	50 (100%)	0.76 (0.23-2.49)	0.6533
At least, one HTT allele ≥ 27CAG	3 (0.7%)	0.89 (0.12-6.69)	0.9062
HER (HR- HER2)	42 (9.74%)		
Age (years)	42 (100%)	0.98 (0.95-1.02)	0.3648
Macroscopic tumor size	42 (100%)		
≤ 25 mm	13 (31.0%)	1	0.4104
>25 mm	29 (69.1%)	0.68 (0.27-1.71)	
SBR histological grade ^a	40 (98.2%)		
I	1 (2.5%)	1	0.3170
II	9 (22.5%)	1	
III	30 (75.0%)	0.53 (0.15-1.84)	
Lymph node status	42 (100.0%)		
0	9 (21.4%)	1	0.2720
1-3	19 (45.2%)	2.38 (0.51-11.23)	
>3	14 (33.3%)	5.27 (1.14-24.41)	
HTT short allele CAG length	42 (100.0%)	1.38 (0.13-14.28)	0.7868
HTT long allele CAG length	42 (100.0%)	11.10 (2.09-58.64)	0.0046**
At least, one HTT allele ≥ 27CAG	0 (0.0%)	-	-
TPN (HR- HER2-)	64 (14.9%)		
Age (years)	64 (100%)	0.98 (0.95-1.02)	0.3223
Macroscopic tumor size	63 (98.4%)		
≤ 25 mm	30 (47.6%)	1	0.8748
>25 mm	33 (52.4%)	1.06 (0.49-2.30)	
SBR histological grade ^a	60 (93.8%)		
I	2 (3.3%)	1	0.8376
II	12 (20.0%)	1	
III	46 (76.7%)	1.10 (0.46-2.64)	

Lymph node status	63 (98.4%)		
0	27 (42.9%)	1	
1-3	29 (46.0%)	0.76 (0.33-1.75)	0.5184
>3	7 (11.1%)	1.14 (0.36-3.59)	0.8249
<i>HTT</i> short allele CAG length	64 (100.0%)	1.81 (0.26-12.57)	0.5462
<i>HTT</i> long allele CAG length	64 (100.0%)	1.89 (0.63-5.71)	0.2592
At least, one <i>HTT</i> allele \geq 27CAG	6 (1.4%)	2.52 (0.86-7.38)	0.0914
Data are HR per ten additional repeat for <i>HTT</i> short, long and average of both alleles; CI, Confidence Interval			
^a Scarff Bloom Richardson classification			

Table 5: Univariate Cox proportional hazards models for predicting metastasis free survival (MFS) of sporadic breast cancer patients regarding molecular-subtypes (cohort 2)

DISCUSSION

Our study reveals an association between the length of the polymorphic CAG tract in wild-type *HTT* and cancer. Indeed, CAG length affected both ovarian cancer risk in carriers of *BRCA2* mutations and breast cancer age at diagnosis in carriers of *BRCA1* mutations. Furthermore, in sporadic breast cancer patients, CAG repeat size appeared as a strong independent factor of metastasis development, specifically in the HER2 subtype. Our observations may be related to the biology of *HTT*, which is regulated according to the length of the polyglutamine sequence encoded by the CAG tract. Similarly, while long CAG repeats in the androgen receptor cause spinal and bulbar muscular atrophy, short repeats influence prostate cancer (Kumar et al., 2011). Although *HTT* is widely expressed, the amount of the protein differs between tissues and cell types within the same tissue (Moreira Sousa and Humbert, 2013; Elias et al., 2014); therefore, polymorphisms of *HTT* may differentially influence various types of cancer. Furthermore, *HTT* may be involved in particular cancer subtypes depending on the signaling pathways engaged in oncogenic processes. *HTT* regulates vesicular trafficking with consequences for axonal transport and endocytosis, and mutant *HTT* impairs these processes (Moreira Sousa and Humbert, 2013). For instance, mutant *HTT* leads to abnormalities in HER2 endocytosis in breast cancer cells, which affect cell motility and metastatic behavior promoting tumorigenesis and metastasis in HD mice (Moreira Sousa et al., 2013). Similarly, sizes of the CAG tract below the pathological range may also regulate *HTT*-mediated endocytosis and affect breast cancer development by the accumulation of HER2.

Our results are consistent with previous studies showing an association between the HD pathological CAG tract in *HTT* and cancer. The incidence of cancer is lower in HD mutation carriers than in the general population (Sorensen et al., 1999; Ji et al., 2012). In these studies however, the cancer outcome was not considered. Furthermore, the CAG repeat length was not available. Instead, Ji and colleagues used age of onset as a surrogate for CAG repeat length but did not find a relationship with the incidence of cancer. Although the prevalence of cancer is low in HD mutation carriers, we observed a relationship between an early age of breast cancer diagnosis and long CAG repeats in a small sample of HD patients (Moreira Sousa et al., 2013).

One unexpected finding of our study involved the prevalence of HD mutation, which has been estimated at between 8 and 12.3 per 100,000 worldwide (Tassicker et al., 2009; Morrison et al., 2011; Evans et al., 2013). However, recent evidence suggests that this is an underestimation. For instance, the prevalence of HD mutation in British Columbia is estimated at 13.7 per 100,000 in the general population and 17.3 per 100,000 in the Caucasian population (Fisher and Hayden, 2013). Studies investigating the prevalence of HD have used estimation models to extend observations from subpopulations of individuals at risk or from patients diagnosed with HD to the general population. Here, we estimated CAG repeat length in a cancer population with *a priori* no HD bias. The length of the non-HD CAG repeat among the studied population was consistent with the reported worldwide average. However, we found at least one patient with a CAG tract longer than 35 repeats in each

cohort. Thus, the prevalence of a pathological CAG repeat was around 1 per 500. How can we interpret this observation? As all patients enrolled in this study had either developed a breast cancer and/or carried *BRCA1* or *BRCA2* mutations, the high prevalence of HD could be specific to breast cancer population. However, this contradicts studies showing that the incidence of cancer is lower in HD patients than in the general population (Sorensen et al., 1999; Ji et al., 2012). Furthermore, we found a similar proportion of HD mutation carriers in an independent cohort affected with inherited ataxia (1:541; EUROSCA cohort; data not shown). Similarly, Perlis and colleagues reported a 3 per 1,000 prevalence of individuals with a CAG repeat length of 36 or greater in a population of individuals diagnosed with major depression (Perlis et al., 2010). Family history of HD was not taken into account during the enrollment of these patients, as in our study. Major depression overlaps with several neurodegenerative conditions and, as opposed to breast cancer, it may be a phenotype associated with the prodromal stage of HD (Pla et al., 2014). However, in light of these observations, it is tempting to speculate that the prevalence of the HD mutation may be higher than previously thought.

We describe associations between the size of the non-pathological CAG tract in *HTT* and features of breast and ovary cancer with potential implications for the follow-up of cancer patients. In particular, CAG length may be used as a prognosis factor. Next generation sequencing strategies, such as exome or whole genome sequencing approaches, do not detect CAG repeats making estimation of prevalence difficult. Future studies should also address the molecular mechanisms underlying our observations. In particular, it would be interesting to investigate the specific regulatory effect of the CAG expansion in *HTT* on various cancer types.

METHODS

Patients

Cohort 1 (supplemental figure 1): Individuals with *BRCA1* and *BRCA2* mutations were recruited through GEMO, a cohort of women carrying a *BRCA1* or *BRCA2* germline mutation. GEMO is the French branch of the international initiative CIMBA (Consortium of Investigators of Modifiers of *BRCA1* and *BRCA2*) (Chenevix-Trench et al., 2007), which aims to identify modifiers of breast cancer risk through the collection of DNA and clinical data from a large number of *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. Participation in the GEMO cohort was proposed during the cancer clinic in which patients were informed of a positive *BRCA1/2* test result. Their informed consent was obtained.

Cohort 2 (supplemental table 1): 431 consecutive primary unilateral invasive primary breast tumors were excised from women at the Institut Curie/Hôpital René Huguenin (France) between 1978 and 2008. All patients admitted before 2007 were informed that their tumor samples might be used for breast cancer progression studies and they were given the opportunity to refuse the use of their samples. Since 2007, patients have also given their approval by signing an informed consent form.

The samples were examined histologically for the presence of tumor cells and considered suitable if the proportion of tumor cells was >70%. Immediately following surgery, the tumor samples were stored in liquid nitrogen until RNA extraction. The patients met the following criteria: primary unilateral non-metastatic breast carcinoma for which complete clinical, histological and biological data were available; no radiotherapy or chemotherapy before surgery; and full follow-up at Institut Curie/Hôpital René Huguenin. Patients underwent physical examinations and routine chest radiography every 3 months for 2 years, and then annually. Mammograms were performed annually. The histological type and the number of positive axillary nodes were established at the time of surgery. The malignancy of infiltrating carcinomas was scored according to the Scarff-Bloom-Richardson (SBR) histoprognostic system. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and HER2 status were determined from protein content by biochemical methods (dextran-coated charcoal method, enzymatic immuno-assay or immunohistochemistry) and confirmed by *ERα*, *PR* and *HER2* real-time quantitative RT-PCR assays. We subdivided our total population (n=431) into four sub-groups: the “luminal” subtype expressed hormonal receptors (HR; ER+ or PR+) and showed no amplification of HER2 (n=275); the “luminal B/HER2” subtype expressed HR (ER+ or PR+) and displayed an overexpression of the HER2 receptor (n=50); the “HER2” subtype did not express HR but was positive for HER2 (ER- and PR-/HER2, n=42); and the “triple negative” subtype was negative for HR and for HER2 overexpression (ER- and PR-/HER2-, n=64). Standard prognostic factors of this tumor set are presented in supplemental table 1. The median of follow-up was 8.9 years (range 6 months to 29 years). For both cohorts, only women with available genotyping information about *HTT* CAG length were included in the analysis.

Determination of *HTT* CAG length by sequencing

Cohort 1: Individuals provided blood samples for *BRCA1/2* genetic testing. DNA was extracted with classical protocols that may have differed among diagnostic laboratories. Cohort 2: Total RNA was extracted from biopsies with the acid-phenol guanidinium method. All samples were sent to GenoScreen, France (www.genoscreen.com). PCR was performed in 25 µL reactions containing 20 ng of template DNA or cDNA, 1× reaction buffer, 37.5 pmol MgCl₂, 6 pmol dNTP, 10 pmol fluorescent primer, 10 pmol primer and 1 U Taq polymerase (FastStart - Roche Diagnostics).

Primers used were: forward: 5'TGGCCCGGTGCTGAG3' and reverse: 5'CGGTGGCGGCTGTTG3'. The PCR cycling consisted of an initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles: denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 62°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. Each amplification product was mixed with Hi-Di Formamide and GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems). Fragments were separated with an Applied Biosystems 3730XL DNA Analyzer. Alleles were scored with GeneMapper v4.0 software (Applied Biosystems).

Statistical analysis

The allele containing the most CAG repeats was designated the 'long' allele; the other was termed the 'short' allele. For each patient, the two alleles were analyzed individually. We also considered carriage of at least one allele exceeding 26 CAG repeats (intermediate alleles) and carriage of at least one allele exceeding 35 CAG repeats (expanded allele).

The influence of the size of *HTT* CAG tract on the risk of breast and/or ovarian cancer in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers was investigated with a retrospective likelihood approach of the observed genotypes conditional on the disease phenotype. This method (Antoniou et al., 2007; Barnes et al., 2012) adjusts for the fact that *BRCA1/2* mutation carriers are not randomly sampled with respect to their disease phenotype. These models, primarily developed for categorical covariates, were adapted when the size of the *HTT* allele was considered as a continuous covariate (short and long alleles). Both single disease risk and competing risk models were implemented in a Fortran program.

First, we analyzed the association of *HTT* CAG repeat length with either breast or ovarian cancer. For the breast cancer risk association analysis, patients were censored at age of the first breast or ovarian cancer, bilateral prophylactic mastectomy or age at last observation, and only individuals with breast cancer were considered as affected. The remaining *BRCA1/2* mutation carriers were assumed to be unaffected for the disease. For the ovarian cancer risk association analysis, patients were censored at age of ovarian cancer, bilateral oophorectomy or age at last observation and only individuals with ovarian cancer were considered as affected. The remaining *BRCA1/2* mutation carriers were assumed to be unaffected for the disease.

Second, we analyzed the association of *HTT* CAG length with both breast and ovarian cancer because mutation carriers are at risk of developing both of these diseases. We used a competing risk analysis and estimated simultaneously hazard ratios for both breast and ovarian cancer. In this method (Barnes et al., 2012), patients were followed up to the age of breast or ovarian cancer diagnosis, whichever occurred first, and were assumed to be affected with the corresponding disease. Patients were censored at the age of bilateral prophylactic mastectomy for breast cancer, bilateral oophorectomy for ovarian cancer or age at last observation and were considered to be unaffected for both diseases. When patients developed breast and ovarian cancers at the same age, they were considered as ovarian cancer cases. ANOVA was used with an empirical sandwich estimator to take into account the effect of family to analyze the association between the age of *BRCA1* or *BRCA2* cancer diagnosis and *HTT* CAG length.

Pearson correlation tests were used to investigate the association between *HTT* CAG tract size and age of onset of sporadic breast cancer. ANOVA was used followed by pairwise comparison with Tukey-Kramer adjustment of *p*-values for significant differences to compare the *HTT* CAG tract size between the categories of qualitative variables. The following variables were tested: macroscopic tumor size (≤ 25 or >25 mm), ER, PR and HER2 receptor status (positive or negative), SBR histological grade (I, II or III), lymph node status (0, 1-3 or >3) and molecular subtypes. Chi-square tests were performed to evaluate whether specific clinicopathological characteristics were present more frequently in patients with ≥ 27 CAG in one *HTT* allele than in patients with <27 CAG in both *HTT* alleles.

Metastasis-free survival (MFS) was defined as the interval of time between surgery and detection of the first metastasis for patients who developed a metastatic disease and time between surgery and last checkup for patients without metastasis. Cox proportional hazard univariate analysis followed by multivariate models with a stepwise procedure were used to evaluate risk factors for the development of metastasis in the whole cohort and in each molecular subtype of breast cancer. For the whole cohort analysis, the following variables were included in the analysis: age at cancer diagnosis, macroscopic tumor size, tumor grade, lymph node status, ER, PR and HER2 status, and consequently, molecular subtype, length of the CAG tract for both *HTT* alleles and the presence of ≥ 27 CAG in one *HTT* allele. For the analysis of each molecular subtype, all variables were included except for ER, PR, HER2 status and molecular subtype. All the variables with a *p*-value < 0.10 in univariate analysis were included in multivariate analysis.

All analyses were performed with SAS version 9.3. *p*-values of 0.05 and below were considered significant.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declared no conflicts of interest.

CONTRIBUTORS

MS Thion designed the study, analyzed data, and drafted the report. S Tézenas du Montcel did the statistical analysis and designed the study. JL Golmard did the statistical analysis. D Stoppa-Lyonnet, L Barjhoux, V Sornin and O Sinilnikova provided cohort 1 samples and associated clinical data; S Vacher and I Bièche provided cohort 2 samples and associated clinical and pathological data. A Durr designed the study. S Humbert designed the study, and drafted the report. All authors edited the report.

ACKNOWLEDGMENTS

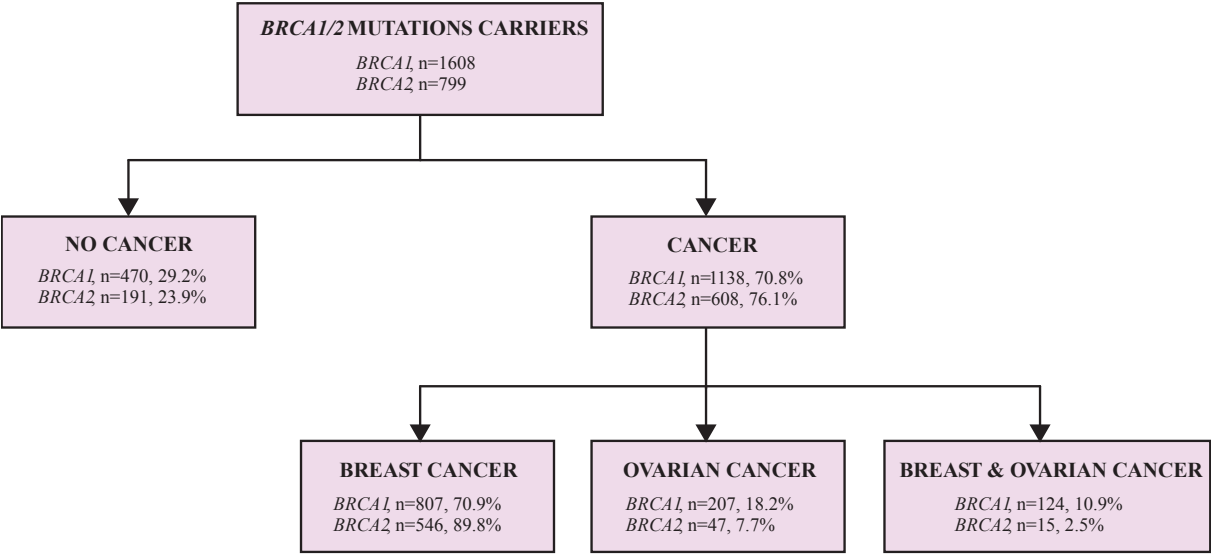
We thank F Saudou, A Vincent-Salomon and members of the Humbert and Saudou's laboratories for discussions. This research was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC subvention libre n°3188 to S.H.), Fondation pour la Recherche Médical (FRM, équipe labellisée to SH), CNRS, INSERM and Institut Curie. MST was supported by an ARC doctoral fellowship. SH is an INSERM investigator.

Genetic Modifiers of Cancer Risk in BRCA1/2 Mutation Carriers (GEMO) study : National Cancer Genetics Network «UNICANCER Genetic Group», France. We wish to thank all the GEMO collaborating groups for their contribution to this study. GEMO Collaborating Centers are: Coordinating Centres, Unité Mixte de Génétique Constitutionnelle des Cancers Fréquents, Hospices Civils de Lyon - Centre Léon Bérard, & Equipe «Génétique du cancer du sein», Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon: Olga Sinilnikova, Sylvie Mazoyer, Francesca Damiola, Laure Barjhoux, Carole Verny-Pierre, Alain Calender, Sophie Giraud, Mélanie Léone; and Service de Génétique Oncologique, Institut Curie, Paris: Dominique Stoppa-Lyonnet, Marion Gauthier-Villars, Bruno Buecher, Claude Houdayer, Virginie Moncoutier, Muriel Belotti, Carole Tirapo, Antoine de Pauw. Institut Gustave Roussy, Villejuif: Brigitte Bressac-de-Paillerets, Olivier Caron. Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand: Yves-Jean Bignon, Nancy Uhrhammer. Centre Léon Bérard, Lyon: Christine Lasset, Valérie Bonadona, Sandrine Handallou. Centre François Baclesse, Caen: Agnès Hardouin, Pascaline Berthet. Institut Paoli Calmettes, Marseille: Hagay Sobol, Violaine Bourdon, Tetsuro Noguchi, Audrey Remenieras, François Eisinger. CHU Arnaud-de-Villeneuve, Montpellier: Isabelle Coupier, Pascal Pujol. Centre Oscar Lambret, Lille: Jean-Philippe Peyrat, Joëlle Fournier, Françoise Révillion, Philippe Vennin, Claude Adenis. Hôpital René Huguenin/Institut Curie, St Cloud: Etienne Rouleau, Rosette Lidereau, Liliane Demange, Catherine Nogues. Centre Paul Strauss, Strasbourg: Danièle Muller, Jean-Pierre Fricker. Institut Bergonié, Bordeaux: Emmanuelle Barouk-Simonet, Françoise Bonnet, Virginie Bubien, Nicolas Sevenet, Michel Longy. Institut Claudius Regaud, Toulouse: Christine Toulas, Rosine Guimbaud, Laurence Gladieff, Viviane Feillel. CHU Grenoble: Dominique Leroux, Hélène Dreyfus, Christine Reischung, Magalie Peysselon. CHU Dijon: Fanny Coron, Laurence Faivre. CHU St-Etienne: Fabienne Prieur, Marine Lebrun, Caroline Kientz. Hôtel Dieu Centre Hospitalier, Chambéry: Sandra Fert Ferrer. Centre Antoine Lacassagne, Nice: Marc Frénay. CHU Limoges: Laurence Vénat-Bouvet. CHU Nantes: Capucine Delnatte. CHU Bretonneau, Tours: Isabelle Mortemousque. Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris: Florence Coulet, Chrystelle Colas, Florent Soubrier. CHU Vandoeuvre-les-Nancy : Johanna Sokolowska, Myriam Bronner. CHU Besançon: Marie-Agnès Collonge-Rame, Alexandre Damette. Creighton University, Omaha, USA: Henry T. Lynch, Carrie L. Snyder. The study was supported by the Ligue National Contre le Cancer; the Association "Le cancer du sein, parlons-en!" Award; and the Canadian Institutes of Health Research for the "CIHR Team in Familial Risks of Breast Cancer" program.

EUROSCA Clinical study was supported by in part by the European Union 6th framework program, EUROSCA/LSHM-CT-2004-503304 and included as principal investigators: J. Berciano, Santander, Sylvia Boesch, Innsbruck, Alexis Brice, Paris, Alessandro Filla, Naples, Paola Giunti, London, Thomas Klockgether, Bonn, Ludger Schols and Olaf Riess, Tübingen, Maria Rakowicz, Warsaw, Caterina Mariotti, Milano, Bela Melegh, Budapest, Massimo Pandolfo, Brussels, Bart van de Warrenburg, Nijmegen

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data includes one figure and three tables.



Supplemental figure 1: Characteristics of BRCA1/2 mutation carriers (cohort 1)

Characteristics	Cases (n=431)
Macroscopic tumor size	
≤ 25 mm	211 (49.9%)
>25 mm	212 (50.1%)
SBR histological grade ^a	
I	55 (13.0%)
II	216 (51.2%)
III	151 (35.8%)
Lymph node status	
0	114 (26.5%)
1-3	225 (52.3%)
>3	91 (21.2%)
ER status	
Negative	111 (25.8%)
Positive	320 (74.3%)
PR status	
Negative	185 (42.9%)
Positive	246 (57.1%)
HER2 status	
Negative	339 (78.7%)
Positive	92 (21.3%)
Molecular subtypes	
Luminal (HR+, HER2-)	275 (63.8%)
Luminal B/HER2 (HR+, HER2)	50 (11.6%)
HER2 (HR-, HER2)	42 (9.7%)
TPN (HR-, HER2-)	64 (14.9%)
Data are year for age and number (%)	
^a Scarff Bloom Richardson classification	

Supplemental table 1: Characteristics of patients with breast cancer of sporadic origin (cohort 2)

Characteristics	HTT allele CAG length		P
	<27CAG	≥ 27CAG	
Age (years)	405 (94.0%)	26 (6.0%)	0.6437
Macroscopic tumor size			
≤ 25 mm	196 (92.9%)	15 (7.1%)	0.2969
>25 mm	202 (95.3%)	10 (4.7%)	
SBR histological grade ^a			
I	49 (89.1%)	6 (10.9%)	0.2516
II	203 (94.0%)	13 (6%)	
III	144 (95.4%)	7 (4.6%)	
Lymph node status			
0	108 (94.7%)	6 (5.3%)	0.7462
1-3	212 (94.2%)	13 (5.8%)	
>3	84 (92.3%)	7 (7.7%)	
ER status			
Negative	105 (94.6%)	6 (5.4%)	0.7474
Positive	300 (93.8%)	20 (6.3%)	
PR status			
Negative	177 (95.7%)	8 (4.3%)	0.1965
Positive	228 (92.7%)	18 (7.3%)	
HER2 status			
Negative	316 (93.2%)	23 (6.8%)	0.2080
Positive	89 (96.7%)	3 (3.3%)	
Molecular subtypes			
Luminal (HR+ HER2-)	258 (93.8%)	17 (6.2%)	0.2649
Luminal B/HER2 (HR+ HER2)	47 (94.0%)	3 (6.0%)	
HER2 (HR- HER2)	42 (100%)	0 (0.0%)	
TPN (HR- HER2-)	58 (90.6%)	6 (9.4%)	
^a Scarff Bloom Richardson classification			

Supplemental table 2: Characteristics of the 431 sporadic breast cancer relative to CAG length of *HTT* (<27 CAG or ≥27) (cohort 2)

	Univariate Model		Multivariate Model	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age (years)	0.99 (0.98-1.00)	0.1081	-	-
Macroscopic tumor size				
≤ 25 mm	1	<0.001***	1	0.0056***
>25 mm	1.97 (1.43-2.72)		1.60 (1.15-2.24)	
SBR histological grade ^a				
I	1	0.0005***	1	0.0041**
II	2.93 (1.42-6.06)		2.88 (1.40-5.91)	
III	4.02 (1.93-8.36)		2.88 (1.40-5.91)	
Lymph node status				
0	1	<0.001***	1	0.0002***
1-3	1.16 (0.78-1.74)		1	
>3	2.50 (1.62-3.97)		1.95 (1.38-2.75)	
ER status				
Negative	1.51 (1.07-2.13)	0.0170*	-	-
Positive	1			
PR status				
Negative	1.62 (1.19-2.21)	0.0023**	-	-
Positive	1			
HER2 status				
Negative	0.78 (0.54-1.12)	0.1761	-	-
Positive	1			
Molecular subtypes				
Luminal (HR+, HER2-)	1	0.0369*	-	-
Luminal B/HER2 (HR+, HER2)	1.07 (0.64-1.76)			
HER2 (HR-, HER2)	1.89 (1.16-3.06)			
TPN (HR-, HER2-)	1.48 (0.96-2.28)			
<i>HTT</i> short allele CAG length	1.97 (0.89-4.36)	0.0947	2.19 (1.01-4.73)	0.0469*
<i>HTT</i> long allele CAG length	0.87 (0.56-1.36)	0.5549	-	-
At least, one <i>HTT</i> allele ≥ 27CAG	0.73 (0.34-1.56)	0.4213	-	-
Data are Hazard Ratio per ten additional repeat for <i>HTT</i> short, long and average of both alleles; CI, Confidence Interval				
^a Scarff Bloom Richardson classification				

Supplemental table 3: Cox proportional hazards models for predicting metastasis free survival (MFS) of the 431 sporadic breast cancer patients (cohort 2)

REFERENCES

- Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B.Y., Kalchman, M.A., *et al.* (1993). The Relationship between Trinucleotide (Cag) Repeat Length and Clinical-Features of Huntingtons-Disease. *Nature Genetics* 4, 398-403.
- Antoniou, A.C., Sinilnikova, O.M., Simard, J., Leone, M., Dumont, M., Neuhausen, S.L., Struewing, J.P., Stoppa-Lyonnet, D., Barjhoux, L., Hughes, D.J., *et al.* (2007). RAD51 135G-->C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. *Am J Hum Genet* 81, 1186-1200.
- Barnes, D.R., Lee, A., Investigators, E., kConFab, I., Easton, D.F., and Antoniou, A.C. (2012). Evaluation of association methods for analysing modifiers of disease risk in carriers of high-risk mutations. *Genet Epidemiol* 36, 274-291.
- Chenevix-Trench, G., Milne, R.L., Antoniou, A.C., Couch, F.J., Easton, D.F., and Goldgar, D.E. (2007). An international initiative to identify genetic modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2 (CIMBA). *Breast Cancer Res* 9, 104.
- Elias, S., Thion, M.S., Yu, H., Sousa, C.M., Lasgi, C., Morin, X., and Humbert, S. (2014). Huntingtin regulates mammary stem cell division and differentiation. *Stem cell reports* 2, 491-506.
- Evans, S.J., Douglas, I., Rawlins, M.D., Wexler, N.S., Tabrizi, S.J., and Smeeth, L. (2013). Prevalence of adult Huntington's disease in the UK based on diagnoses recorded in general practice records. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 84, 1156-1160.
- Fisher, E.R., and Hayden, M.R. (2013). Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: Prevalence and population at risk. *Mov Disord* 29, 105-114.
- Group, T.H.s.D.C.R. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72, 971-983.
- Ji, J., Sundquist, K., and Sundquist, J. (2012). Cancer incidence in patients with polyglutamine diseases: a population-based study in Sweden. *The lancet oncology* 13, 642-648.
- Kelsey, J.L., Gammon, M.D., and John, E.M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiologic reviews* 15, 36-47.
- Killoran, A., Biglan, K.M., Jankovic, J., Eberly, S., Kayson, E., Oakes, D., Young, A.B., and Shoulson, I. (2013). Characterization of the Huntington intermediate CAG repeat expansion phenotype in PHAROS. *Neurology* 80, 2022-2027.
- Kumar, R., Atamna, H., Zakharov, M.N., Bhasin, S., Khan, S.H., and Jasuja, R. (2011). Role of the androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer, and spinal and bulbar muscular atrophy. *Life sciences* 88, 565-571.
- Lee, J.M., Ramos, E.M., Lee, J.H., Gillis, T., Mysore, J.S., Hayden, M.R., Warby, S.C., Morrison, P., Nance, M., Ross, C.A., *et al.* (2012). CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology* 78, 690-695.
- Moreira Sousa, C., and Humbert, S. (2013). Huntingtin: here, there, everywhere! *Journal of Huntington's disease* 2, 395-403.

Moreira Sousa, C., McGuire, J.R., Thion, M.S., Gentien, D., de la Grange, P., Tezenas du Montcel, S., Vincent-Salomon, A., Durr, A., and Humbert, S. (2013). The Huntington disease protein accelerates breast tumour development and metastasis through ErbB2/HER2 signalling. *EMBO molecular medicine* 5, 309-325.

Morrison, P.J., Harding-Lester, S., and Bradley, A. (2011). Uptake of Huntington disease predictive testing in a complete population. *Clinical genetics* 80, 281-286.

Narod, S.A., and Foulkes, W.D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature reviews Cancer* 4, 665-676.

Perlis, R.H., Smoller, J.W., Mysore, J., Sun, M., Gillis, T., Purcell, S., Rietschel, M., Nothen, M.M., Witt, S., Maier, W., *et al.* (2010). Prevalence of incompletely penetrant Huntington's disease alleles among individuals with major depressive disorder. *The American journal of psychiatry* 167, 574-579.

Pla, P., Orvoen, S., Saudou, F., David, D.J., and Humbert, S. (2014). Mood disorders in Huntington's disease: from behavior to cellular and molecular mechanisms. *Front Behav Neurosci* 8, 135.

Rubinsztein, D.C., Leggo, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J.J., Chotai, K., Connarty, M., Crauford, D., Curtis, A., *et al.* (1996). Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *American journal of human genetics* 59, 16-22.

Semaka, A., and Hayden, M. (2013). Evidence-Based Genetic Counselling Implications for Huntington Disease Intermediate Allele Predictive Test Results. *Clin Genet*.

Snell, R.G., MacMillan, J.C., Cheadle, J.P., Fenton, I., Lazarou, L.P., Davies, P., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Harper, P.S., and Shaw, D.J. (1993). Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* 4, 393-397.

Sorensen, S.A., Fenger, K., and Olsen, J.H. (1999). Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: An apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? *Cancer* 86, 1342-1346.

Tassicker, R.J., Teltscher, B., Trembath, M.K., Collins, V., Sheffield, L.J., Chiu, E., Gurrin, L., and Delatycki, M.B. (2009). Problems assessing uptake of Huntington disease predictive testing and a proposed solution. *European journal of human genetics : EJHG* 17, 66-70.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

L'intérêt initial porté à la protéine HTT trouve son origine dans le fait qu'une mutation dans le gène qui la code entraîne le développement de la MH, une maladie neurodégénérative héréditaire. Comme nous l'avons abordé précédemment, d'importants progrès ont été accomplis depuis le début des années quatre-vingt-dix concernant les connaissances de la MH et les rôles de la protéine HTT. Cette protéine d'échafaudage participe à des fonctions indispensables à la cellule et apparaît tel un élément central au centre de multiples voies de signalisation facilitant les interactions protéiques nécessaires à la formation de complexes macromoléculaires. Les études de ses fonctions ont été majoritairement menées dans le contexte du système nerveux et ont permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires entraînant la toxicité de la protéine mutée. A l'inverse, ses rôles n'ont été que très peu étudiés dans les organes périphériques, malgré son expression conservée dans de nombreux tissus et certains symptômes périphériques qui se développent chez les individus atteints de la MH.

L'ensemble des travaux de recherche poursuivis au sein de notre laboratoire a permis d'éclaircir les fonctions de la HTT dans la glande mammaire à la fois au cours de son développement normal, mais aussi en condition pathologique durant la carcinogenèse mammaire. Nos travaux suggèrent que la HTT est indispensable au développement normal de la glande mammaire en contrôlant la division et la différenciation des cellules mammaires progénitrices (Article 4, Elias et al. 2014). Nous avons montré qu'elle est impliquée dans la progression tumorale mammaire en partie par son rôle dans l'adhésion intercellulaire, ce rôle étant lui-même régulé par sa phosphorylation à la sérine 421 (Articles 1 et 2). Une forte expression transcriptionnelle et protéique de HTT favorise la différenciation épithéliale des cellules mammaires tumorales et est associée aux sous-types moléculaires humains les plus différenciés. A l'opposé, sa perte d'expression est pro-métastatique et est prépondérante pour les cancers les moins différenciés et les plus agressifs (Article 1). Nous nous sommes aussi intéressés à l'influence de la longueur de la répétition CAG présente dans la *HTT* et nos résultats suggèrent un « double emploi » pour la *HTT*, et ce, selon son polymorphisme CAG : tandis que de longues répétitions de CAG protègent de l'apparition de cancers, lorsque la maladie se développe, elles accentueraient sa sévérité (Articles 2 et 3, Moreira Sousa et al., 2013).

Ces observations soulèvent bon nombre de questions. Tout d'abord, comment la HTT régule-t-elle la différenciation des cellules mammaires épithéliales dans un contexte développemental non pathologique et dans un contexte pathologique au cours de la carcinogenèse mammaire ? Etant donné l'implication de la S421-P-HTT dans la progression tumorale, quels sont les régulateurs de l'expression de la HTT et de sa phosphorylation à la sérine 421 dans les tissus mammaires ? Quels sont les rôles potentiels de la voie IGF-1/PI3K et des kinases AKT et SGK dans cette régulation ? Pour finir, comment la longueur de la répétition CAG présente dans le gène codant la *HTT* peut-elle être adjointe à deux phénotypes opposés : la protection contre le développement de cancer mais

l'augmentation de sa sévérité lorsqu'il se développe ? Serait-ce un mécanisme commun à l'ensemble des protéines à répétitions CAG ?

I. La HTT et sa phosphorylation à la sérine 421 dans l'adhésion intercellulaire

Les résultats présentés ont contribué à décrire les fonctions de la HTT dans l'adhésion intercellulaire au sein de la glande mammaire dans un contexte normal et pathologique. D'autres études suggèrent que la HTT est impliquée dans l'adhésion cellulaire, à la fois dans des jonctions serrées et dans les jonctions adhérentes.

I.1. Les jonctions serrées

La HTT régule la cadhérine neuronale, la N-cadhérine, une protéine d'adhésion essentielle au développement neuronal (Reis et al., 2011; Lo Sardo et al., 2012). Dans des neurones exprimant une forme mutante de HTT, l'expression transcriptionnelle est diminuée et est associée à une altération de l'adhésion intercellulaire ainsi que l'adhésion cellule-substrat (Reis et al., 2011). La HTT, en interagissant avec ADAM10 (ADAM metallopeptidase domain 10), régule le clivage de la N-cadhérine par ADAM10. Ainsi, l'absence de HTT conduit à une augmentation du clivage de la N-cadhérine par ADAM10 ; ce clivage excessif est responsable de l'altération de l'adhésion. En absence d'expression de la HTT, on observe une altération de l'organisation des cellules neuroépithéliales accompagnée d'une diminution d'expression de la N-cadhérine et de ZO1 (Lo Sardo et al., 2012). Dans cette même étude, l'inactivation de la HTT chez le poisson zèbre entraîne une désorganisation de ZO1 au niveau de la ligne médiane, dans la région antérieure du tube neural en développement, ainsi qu'une diminution de son expression.

D'une façon similaire, au cours du développement normal de la glande mammaire, nous avons montré que l'ablation de la HTT dans l'assise basale des canaux mammaires altère l'orientation du fuseau mitotique des cellules progénitrices mammaires et l'acquisition de leur identité basale ou luminal (Article 4, Elias et al. 2014). Ces résultats rappellent ceux que nous avons observés au cours de la neurogenèse où la diminution de HTT entraîne une altération du fuseau mitotique et une altération du destin cellulaire des cellules progénitrices (Godin et al., 2010a). Le promoteur kératine 5 conduit spécifiquement à l'expression de la *Cre* dans l'assise basale chez les souris K5-cre. Cependant, dans le modèle K5-cre/*Hdh*^{flox/flox}, l'expression de la HTT est diminuée dans l'assise basale et également partiellement dans l'assise luminale. Nous ne pouvons donc pas exclure que la diminution de l'expression de la HTT dans l'assise luminale participe également aux phénotypes observés. Dans l'épithélium mammaire de ces souris, nous avons observé une diffusion des

marqueurs des jonctions intercellulaires (la E-cadhérine, PAR3, ZO1 et aPKC) de la membrane plasmique vers le cytoplasme des cellules épithéliales. Ce défaut de polarisation cellulaire est probablement lié à l'altération de la différenciation luminale de ces cellules et, potentiellement, à la diminution d'expression de la HTT dans les cellules luminales.

Dans le contexte pathologique de la carcinogenèse mammaire, la HTT est impliquée dans la stabilité des jonctions intercellulaires (Article 1 et Article 3, Moreira Sousa et al. 2013). Dans des modèles murins de la MH combinés à des modèles de carcinogenèse mammaire, l'expression de la HTT-m entraîne une perte d'expression de certaines cadhérines, et une diminution de ZO1 associées à une augmentation des capacités métastatiques des cellules tumorales.

Une diminution de HTT entraîne une diminution d'expression de ZO1 et une délocalisation des protéines ZO1 encore exprimées de la membrane plasmique au cytoplasme (Article 1). A l'inverse, une diminution de l'expression de ZO1 n'altère pas l'expression de la HTT. Nous n'avons pas observé de diminution majeure de E-cadhérine ni de β -caténine dans nos modèles cellulaires et murins.

Dans des lignées mammaires et des carcinomes humains *in situ*, la forme phosphorylée de la HTT colocalise avec ZO1 aux jonctions serrées. De plus, nous avons observé que l'expression de ZO1 et celle de la HTT corrélaient dans les carcinomes mammaires humains. A l'instar de la S421-P-HTT, l'expression de ZO1 est diminuée dans les tissus tumoraux en comparaison des tissus mammaires sains (Tokes et al., 2012). ZO1 partage une homologie de séquence avec le suppresseur de tumeur *DLG* (discs, large homolog) exprimé chez la drosophile (Willott et al., 1993), suggérant qu'il pourrait posséder les mêmes propriétés de gène suppresseur de tumeur chez les mammifères. L'expression de ZO1, comme celle de la HTT, corrèle avec la différenciation tumorale et particulièrement la différenciation glandulaire des tumeurs mammaires (Hoover et al., 1998). La perte d'expression de ZO1 est liée à un pronostic défavorable et est observée dans les tumeurs primaires métastatiques (Martin et al., 2004).

Au niveau moléculaire, ZO1, la HTT et la S421-P-HTT sont fortement exprimés dans les carcinomes différenciés de type luminal où ZO1 et la S421-P-HTT sont localisés au niveau des jonctions intercellulaires en comparaison des carcinomes de type basal qui présentent un plus faible marquage membranaire de ZO1. De façon très intéressante dans les carcinomes de type basal, nous avons observé une localisation nucléaire de ZO1. ZO1 régule la progression du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire de façon dépendante de la densité cellulaire, par la transcription de facteur ZONAB (Balda et al., 2003). Dans des cellules épithéliales en prolifération, ZONAB est distribué aussi bien au niveau nucléaire qu'au niveau des jonctions serrées mais il ne se localise pas dans les noyaux des cellules confluentes non prolifératives (Balda and Matter, 2000; Balda et al., 2003). La perte d'expression de ZO1 au cours de la progression tumorale favoriserait la prolifération cellulaire et

diminuerait l'adhésion intercellulaire participant ainsi à la perte de polarité et d'inhibition de contact favorisant ainsi la progression métastatique. Dans notre étude, la prolifération des carcinomes mammaires murins exprimant une forme de HTT mimant une perte de phosphorylation est accrue en comparaison des souris exprimant une forme de HTT mimant une phosphorylation constitutive. Dans nos modèles cellulaires, la diminution de HTT n'altère pas la prolifération des cellules néoplasiques mammaires. On pourrait émettre l'hypothèse que la HTT participe aussi à la régulation de ZONAB *par* ZO1. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier la localisation de ZONAB ainsi que la régulation de ses gènes cibles en absence de HTT ou en forçant la phosphorylation à la sérine 421 de la HTT.

La HTT et ZO1 semblent donc faire partie d'un même complexe moléculaire impliqué dans l'adhésion intercellulaire, régulé par la HTT elle-même. Ce rôle dans l'adhésion intercellulaire peut, en partie, expliquer la perte d'expression de la *HTT* dans les cancers métastatiques. En effet, l'altération des contacts intercellulaires contribue à la perte de polarité et d'inhibition de contact entraînant, d'une part, une prolifération incontrôlée à l'origine du développement de cancer, et constituant, d'autre part, un avantage sélectif à la progression métastatique. Nous proposons que la HTT, en modulant l'expression et la localisation de ZO1 (notamment par sa forme phosphorylée qui séquestrerait ZO1 et potentiellement d'autres facteurs de transcription comme ZONAB au niveau des jonctions serrées) contrôle la stabilité des jonctions intercellulaires et ainsi la différenciation épithéliale et la prolifération cellulaire. La HTT potentialiserait ainsi les effets suppresseurs de tumeur de ZO1.

Les microtubules sont essentiels à la dynamique des jonctions serrées bien que leur rôle soit peu décrit dans ce contexte (Glotfelty et al., 2014). Comme abordé précédemment (voir Chap.4, IV.2), la S421-P-HTT module la direction du transport vésiculaire dans un contexte neuronal ; on peut imaginer que la HTT régule le transport de ZO1 vers les jonctions serrées. Cependant, lorsque le plasmide ZO1-GFP est exprimé dans des cellules MCF7 dans lesquelles l'expression de la HTT est stablement diminuée, ZO1-GFP se localise aux niveaux des jonctions intercellulaires (donnée non montrée). Bien qu'en condition de surexpression, ce résultat suggère qu'en absence de HTT, ZO1 peut être transporté aux jonctions intercellulaires, renforçant l'idée que la HTT participerait à la stabilité des jonctions intercellulaires, plus qu'au transport des protéines constituant ces jonctions. Etant donné que la HTT interagit avec PAR3 ou encore avec la spectrine (Shirasaki et al., 2012), une protéine d'échafaudage faisant le lien entre les filaments d'actine et ZO1, elle pourrait, par ces interactions, réguler la stabilité des jonctions serrées et cela en fonction de son état de phosphorylation à la sérine 421. Ainsi, en présence de HTT et notamment de S421-P-HTT, la localisation de ZO1 est majoritairement membranaire et la dynamique des jonctions serait stabilisée favorisant la différenciation épithéliale plutôt que la progression métastatique des cellules tumorales mammaires. En absence de HTT ou lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, ZO1 serait déstabilisé des

jonctions serrées et pourrait se relocaliser au niveau du noyau. De plus, la perte de ZO1 au niveau des jonctions intercellulaires libérerait ZONAB des jonctions lui permettant de réaliser son rôle de facteur de transcription au sein du noyau, ce qui pourrait expliquer l'augmentation des capacités prolifératives des tumeurs exprimant une forme mimant une perte de S421-P-HTT.

I.2. Les jonctions adhérentes

L'implication de la HTT dans l'adhésion intercellulaire ne se limite pas aux jonctions serrées. En effet, nous avons vu précédemment que la déplétion de la HTT ainsi que l'expression de la HTT-m pouvaient diminuer l'expression de la E-cadhérine et de β -caténine dans des lignées et tissus mammaires (Article 1 et Article 3, Moreira Sousa et al. 2013). La HTT est impliquée dans la régulation de la β -caténine, notamment dans sa dégradation et dans l'activation de la voie WNT (Gines et al., 2003; Godin et al., 2010b; Dupont et al., 2012). La β -caténine joue un rôle majeur (1) dans l'adhésion cellulaire en se localisant aux jonctions adhérentes par son interaction avec les cadhérines et (2) dans la signalisation cellulaire et la transcription comme coactivateur transcriptionnel de la voie WNT, impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire (pour article de revue, voir (Kim et al., 2013)). Plusieurs études ont mis en évidence une accumulation de β -caténine et de armadillo, son homologue chez la drosophile, dans des modèles de la MH (Gines et al., 2003; Godin et al., 2010b; Dupont et al., 2012). La β -caténine est retrouvée accumulée dans des extraits de cerveaux post-mortem d'individus atteints de la MH et des souris modèles pour la MH (Godin et al., 2010b). Dans un contexte neuronal, la HTT interagit avec la β -caténine et son complexe de dégradation par son interaction avec β -TrCP (β -transducin repeat containing protein) et l'axine. La présence d'une expansion pathologique de glutamines dans la HTT-m diminue son interaction avec la β -caténine, qui se lie alors moins avec son complexe de dégradation, entraînant ainsi son accumulation toxique. L'inhibition de cette accumulation de β -caténine ou de la voie WNT lorsque la HTT est mutante est neuroprotectrice démontrant que cette voie de signalisation WNT/ β -caténine participe à la toxicité induite par la présence de la HTT-m (Godin et al., 2010b; Dupont et al., 2012).

Nous n'avons pas observé de diminution majeure de E-cadhérine ni de β -caténine dans la plupart de nos modèles cellulaires et murins. Cependant, dans les cellules 4T1, la diminution de la HTT entraîne une réduction de l'expression de E-cadhérine et de β -caténine. Cette différence pourrait être due aux spécificités et origines des lignées mammaires utilisées au cours de nos études. Il serait intéressant de déterminer si la phosphorylation de la HTT à la sérine 421 est impliquée dans la régulation de la dégradation de la β -caténine. La HTT phosphorylée pourrait réguler l'équilibre entre localisation membranaire, dégradation et localisation nucléaire de la β -caténine. Il est aussi envisageable que la S421-P-HTT module directement l'interaction de la HTT avec ZO1 et la β -caténine ou encore qu'elle module la localisation de β -caténine.

II. Quels sont les mécanismes à l'origine de la régulation transcriptionnelle de la *HTT* ?

Dans des carcinomes mammaires humains de haut grade peu différenciés, l'expression transcriptionnelle et protéique de la *HTT* est fortement réduite (Article 1). Les carcinomes mammaires de type luminaux expriment fortement la *HTT* en comparaison au type HER2, qui lui-même, exprime des niveaux plus importants de *HTT* que le type basal. De plus, son expression transcriptionnelle est diminuée dans les cancers métastatiques. Quels sont les mécanismes responsables de cette régulation transcriptionnelle ? Aucune amplification ou délétion dans la région du chromosome 4p16.3 n'a été reportée à ce jour dans les carcinomes mammaires. Les études s'intéressant aux régulations transcriptionnelles de la *HTT* ne sont que peu nombreuses bien qu'à priori de telles études seraient essentielles pour appréhender sa fonction et les mécanismes moléculaires à l'origine de ces modulations d'expression. Les régulations épigénétiques et transcriptionnelles qui pourraient participer à la régulation de l'expression de la *HTT* peuvent être variées. On peut imaginer que la méthylation du promoteur de la *HTT*, des facteurs de transcription tels que P53, des micro ARNs (miARNs) et/ou encore des ARNs antisenses réguleraient l'expression de la *HTT*.

Par exemple, le suppresseur de tumeur P53 interagit avec la *HTT* et est retrouvé muté dans de nombreux carcinomes mammaires (Steffan, Kazantsev et al. 2000)(Petitjean et al., 2007). P53 se lie à la *HTT* qui contient des éléments de réponse à P53 et régule ainsi son expression (Steffan et al., 2000; Feng et al., 2006). Etant donné que les mutations de P53 sont prédominantes dans le sous-type basal par comparaison avec les autres sous-types (Dumay et al., 2013), la perte de P53 pourrait participer à la diminution d'expression de *HTT* particulièrement observée dans le sous-type basal.

L'hyperméthylation dans la région promotrice du gène de la *HTT* dans les cancers métastatiques pourrait expliquer les diminutions d'expression observées. Différentes techniques pourraient notamment être envisagées afin de déterminer si la méthylation du promoteur de la *HTT* est impliquée dans la régulation de son expression dans les cellules mammaires tumorales. Ainsi, le profil de méthylation du promoteur de la *HTT* peut être analysé par la méthode de conversion au bisulfite de sodium (Frommer et al., 1992). Un traitement au bisulfite de sodium entraîne une désamination des cytosines en uraciles, cette désamination étant plus rapide si les cytosines sont méthylées. Ainsi, dans les conditions expérimentales de cette réaction, seules les cytosines méthylées seront transformées en uracile et la séquence d'ADN obtenue contiendra uniquement les cytosines méthylées à l'origine. Après analyse du polymorphisme de la séquence (C ou T), les cytosines méthylées seront alors identifiées. Une autre technique consiste à isoler les régions d'ADN méthylé en utilisant des anticorps dirigés contre les 5-méthylcytidines avant analyse (Weber et al., 2005).

Nous avons établi, par une approche candidat, une liste des miARNs prédits comme interagissant avec la séquence 3'UTR du gène de la *HTT*. En utilisant au moins deux algorithmes pour prédire les cibles de miARN tels que TargetScan, PicTar, Miranda, PITA et en nous appuyant sur la littérature, nous avons sélectionné des miARNs ciblant la *HTT* qui présentent des variations d'expression opposées à celles de la *HTT* dans les carcinomes mammaires humains et qui sont impliqués dans le processus métastatique. Par exemple, à l'inverse de la *HTT*, le miARN 221 est diminué dans les carcinomes *in situ* en comparaison des tissus sains et augmenté dans les carcinomes invasifs en comparaison des carcinomes *in situ* (Volinia et al., 2012). Au niveau moléculaire, il est fortement exprimé dans le sous-type basal et les carcinomes classifiés RE négatif (Tang et al., 2012). Il régule la TEM (transition épithélio-mésenchymateuse), sa surexpression diminue les capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales. D'autre part, l'expression du miARN 125b est diminuée dans les tumeurs humaines en comparaison des tissus sains et ce dernier est surexprimé dans les tumeurs métastatiques (Tang et al., 2012; Volinia et al., 2012; Cascione et al., 2013). Il présente une forte expression dans les cellules MDAMB-231 et sa surexpression dans les cellules MCF7 augmente leurs capacités de migration (Harquail et al., 2012). Le miARN 146b, quant à lui, est surexprimé dans les carcinomes de type basal en comparaison des carcinomes de types luminal A ou luminal B (Blenkiron et al., 2007). Nous avons ainsi ciblé trente miARNs dont les niveaux d'expression seront prochainement évalués sur des échantillons sélectionnés parmi une des cohortes de patientes analysée précédemment : des carcinomes présentant des niveaux d'expression transcriptionnelle de *HTT* faibles et un mauvais pronostic par comparaison avec des carcinomes ayant de forts niveaux d'expression transcriptionnelle de *HTT* (échantillons de la cohorte A de l'Article 1, collaboration I. Bièche, Institut Curie). En fonction des résultats obtenus, l'effet des miARNs d'intérêt pourrait être testé *in vitro*. Il serait intéressant d'exprimer une construction contenant la luciférase et la séquence 3'UTR du gène codant la *HTT* ainsi que le miARN d'intérêt dans les MCF7 (ou encore, un inhibiteur du miARN dans les MDA-MB 231) afin de déterminer si le miARN candidat cible les transcrits de *HTT*. Dans ce cas, le miARN clive la séquence 3'UTR présente, et l'expression de la luciférase est diminuée. L'expression du ou des miARNs d'intérêt pourrait ensuite être analysée dans une cohorte plus large de femmes atteintes de cancer du sein.

III. La phosphorylation de la HTT dans les cancers du sein

Dans nos modèles murins, la progression tumorale est modulée selon l'état de phosphorylation à la sérine 421 de la HTT (Article 2). Une perte de phosphorylation favorise le développement de tumeurs mammaires qui sont plus prolifératives, et présentent des capacités de migration accrues. Dans les tissus humains, il est difficile de réaliser des comparaisons entre l'expression de la HTT et celle de la S421-P-HTT. En effet, nous avons quantifié l'intensité de

l'expression de la HTT, tandis que, pour la S421-P-HTT, nous avons évalué sa présence ou son absence. Toutefois, contrairement à l'expression de la HTT totale qui est augmentée dans les carcinomes mammaires en comparaison des tissus sains, on observe une diminution du nombre de carcinomes exprimant la S421-P-HTT, alors qu'elle est retrouvée phosphorylée dans quasiment dans l'intégralité des tissus mammaires sains (Figure 26). Cette diminution est d'autant plus importante dans les carcinomes infiltrants en comparaison des carcinomes *in situ*. Ainsi, tissus sains et carcinomes infiltrants expriment de faibles de taux de HTT totale en comparaison des carcinomes *in situ*. Néanmoins, la majorité des tissus sains expriment la S421-P-HTT, alors que c'est le cas de peu de carcinomes infiltrants. Ces modulations d'expression de la S421-P-HTT ne semblent donc pas résulter uniquement de variations d'expression de la HTT mais aussi de l'état de différenciation des tissus mammaires. Dans les carcinomes infiltrants, une expression importante de HTT est associée à un bas grade tumoral et à un nombre important de carcinomes exprimant la S421-P-HTT, et inversement.

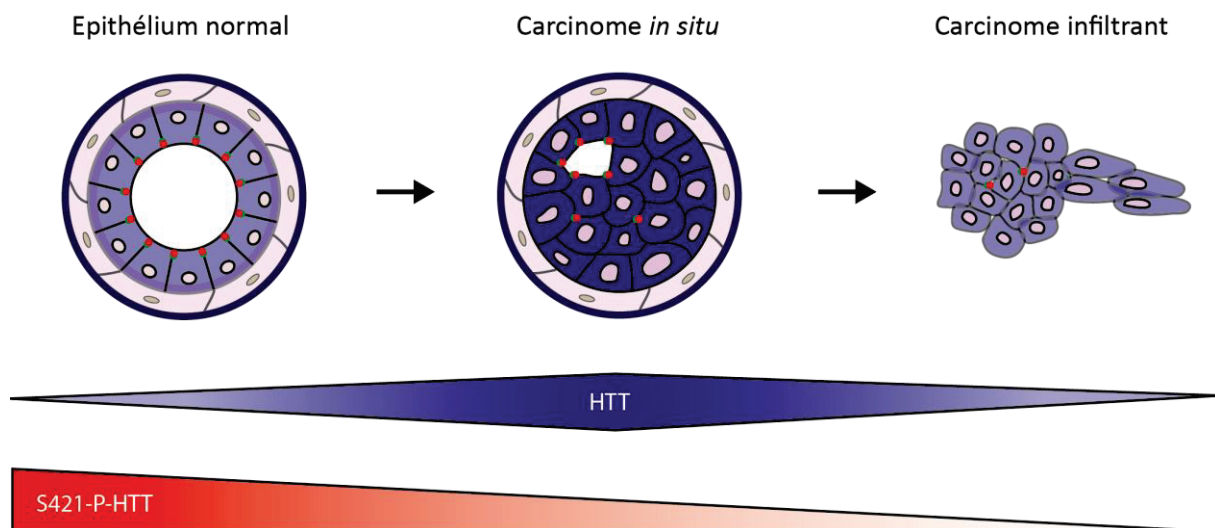


Figure 26 | Représentation schématique de l'expression et de la localisation cellulaire de la HTT (en bleu) et de la S421-P-HTT (en rouge) au cours de la progression tumorale mammaire.

L'expression de la HTT est accrue dans les carcinomes *in situ* en comparaison au tissu sain et aux carcinomes infiltrants. A l'inverse, on observe une diminution du nombre de carcinomes exprimant la S421-P-HTT alors qu'elle est phosphorylée dans quasiment l'intégralité des tissus sains. Cette diminution est d'autant plus importante dans les carcinomes infiltrants en comparaison des carcinomes *in situ*. Dans les tissus sains, la S421-P-HTT se localise spécifiquement au niveau apical des cellules épithéliales et elle est retrouvée accumulée au niveau des lumières et jonctions intercellulaires dans les tissus tumoraux.

L'expression de variants de HTT mimant une perte de phosphorylation à la sérine 421 entraîne des phénotypes cellulaires de migration et d'invasion similaires à ceux observés lorsque l'expression de HTT est diminuée dans des lignées cellulaires (données non montrées). De plus, mimer une perte de phosphorylation entraîne une diminution de ZO1 dans les carcinomes mammaires. La perte de phosphorylation semble donc être associée à une perte de fonction de la HTT dans nos conditions expérimentales. La voie IGF-1 a été impliquée dans l'adhésion intercellulaire des cellules MCF7 et dans une lignée de carcinome épidermoïde (Mauro et al., 2001; Ko et al., 2009). Un traitement à l'IGF-1 ne modifie pas les expressions de E-cadhérine et β -caténine mais augmente l'expression transcriptionnelle et protéique de ZO1, renforçant ainsi l'association entre la E-cadhérine et le

cytosquelette d'actine. L'interaction entre le récepteur à l'IGF avec ZO1 au sein d'un complexe avec la E-cadhérine et la β -caténine pourrait expliquer les effets anti-métastatiques de l'IGF-1. On peut imaginer que la HTT fait partie de ce même complexe et permet, par ses rôles de protéine d'échafaudage, de stabiliser ce dernier. Chez les individus atteints de la MH, la phosphorylation à la sérine 421 de la HTT est altérée (Rangone et al., 2004; Colin et al., 2005; Warby et al., 2005). Il est donc possible que dans un contexte MH, la diminution de phosphorylation participe de façon concomitante à la présence de l'expansion polyQ dans la HTT pour favoriser la migration et l'invasion cellulaire.

Quels sont les régulateurs de cette phosphorylation dans les tissus mammaires sains et tumoraux ? AKT1 et SGK1 phosphorylent la HTT à la sérine 421 dans des modèles cellulaires (Humbert et al., 2002; Rangone et al., 2004). La voie PI3K/AKT régule diverses fonctions biologiques, telles que la prolifération, la survie et la motilité cellulaire, ces processus étant essentiels au développement et à la progression des cancers. Nombre des acteurs de cette voie sont soit des oncogènes (tels que AKT, la PI3KCA, la cycline D1), soit des suppresseurs de tumeurs (tels que PTEN). PTEN agit en suppresseur de tumeur par sa capacité à déphosphoryler les lipides inositol 3'-phosphorylés et ainsi inhiber la phosphorylation d'AKT par la PI3K (Stambolic et al., 1998). Il n'est donc pas surprenant que des acteurs de la voie PI3K soient dérégulés dans de nombreux cancers, dont les cancers du sein (Hennessey et al., 2005; Cancer Genome Atlas, 2012).

Il existe trois isoformes d'AKT (AKT1/PKB α , AKT2/PKB β , et AKT3/PKB γ) qui présentent deux régions conservées notamment dans leur domaine catalytique (Manning and Cantley, 2007). AKT1 et AKT3 sont exprimés au niveau des cellules épithéliales mammaires et dans le stroma murin à des niveaux similaires tandis que l'expression d'AKT2 est prédominante dans les cellules stromales (Maroulakou et al., 2007). Dans des modèles murins transgéniques, AKT1 favorise la prolifération carcinomateuse et inhibe la progression métastatique (Hutchinson et al., 2004; Maroulakou et al., 2007). *In vitro*, AKT1 inhibe la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires (Irie et al., 2005; Yoeli-Lerner et al., 2005). A l'inverse, la délétion d'AKT2 accélère l'apparition de carcinomes mammaires et AKT2 favorise l'invasion et la métastase des cellules tumorales (Arboleda et al., 2003; Maroulakou et al., 2007; Dillon et al., 2009). La délétion d'AKT3 ne présente que peu d'effet *in vivo* (Maroulakou et al., 2007). L'effet anti-métastatique spécifique d'AKT1 qui phosphoryle la HTT à la S421 est en bon accord avec nos résultats. A l'heure actuelle, la ou les isoforme(s) qui phosphoryle(nt) la HTT à la sérine 421 chez les patientes atteintes d'un cancer du sein sont inconnu(s). Il serait très intéressant de déterminer quelle(s) isoforme(s) d'AKT phosphoryle(nt) la HTT à la sérine 421 et mais également comment leurs expressions et leurs activités kinases sont régulées temporellement et/ou spatialement dans le tissu mammaire sain et cancéreux. Chez le modèle murin PyVT, les expressions d'AKT1 et ATK3 sont augmentées dans les cellules tumorales par rapport aux tissus sains à l'inverse de l'expression d'AKT2 qui est diminuée (Maroulakou et al., 2007). L'activation

de la voie AKT dans le modèle PyVT corrèle avec nos observations concernant la carcinogenèse mammaire, qui est semblable entre les souris PyVT/*Hdh*^{+/+} et les PyVT/*Hdh*^{S421D/S421D} (Article 1).

Au niveau histologique, la fréquence des mutations PIK3CA apparaît similaire entre les carcinomes mammaires *in situ* et infiltrants (Miron et al., 2010) et la voie AKT serait activée précocement au cours de la progression tumorale, dès la formation d'un carcinome *in situ* (Bose et al., 2006). La perte de PTEN a été associée à la progression de carcinome *in situ* à carcinome invasif ainsi qu'au haut grade histopronostique (Bose et al., 2006). Aucune de ces dernières observations, n'expliquent la diminution du nombre de carcinomes infiltrants exprimant la S421-P-HTT par comparaison avec carcinomes *in situ*. De façon similaire à AKT, quelle est l'implication de la kinase SGK dans la phosphorylation de la HTT au cours de la carcinogenèse mammaire ? La SGK est une kinase anti-apoptotique qui favorise la survie des cellules épithéliales mammaires (Mikosz et al., 2001). Elle apparaît surexprimée dans de nombreux carcinomes mammaires mais a été peu étudiée (Sahoo et al., 2005). Elle pourrait participer à la régulation de la phosphorylation de la HTT dans les carcinomes mammaires, ainsi que d'autres kinases et voies de signalisation.

Cibler la S421-P-HTT aurait-il un intérêt *in vivo* ? Au vu de nos résultats, il serait intéressant d'augmenter cette phosphorylation, par traitement à l'IGF-1 par exemple, car elle pourrait potentiellement avoir des effets anti-tumoraux et anti-métastatiques. Néanmoins, IGF-1 cible les différentes isoformes d'AKT et pourrait donc entraîner des effets opposés sur la progression tumorale. Une alternative serait de cibler directement la calcineurine, la phosphatase déphosphorylant la HTT à la S421 (bien que la HTT ne soit pas son unique cible). En effet, l'administration de FK506 (tacrolimus), un inhibiteur de l'activité phosphatase de la calcineurine, augmente la phosphorylation de la HTT *in vivo* (Pardo et al., 2006). Ce médicament est un immunosuppresseur utilisé lors de greffes d'organes de par sa capacité à inhiber l'activité du régulateur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cells), impliqué dans la réponse immunitaire. Dans le modèle murin MMTV-Neu, il a été montré que l'administration de FK506 inhibe la croissance tumorale *in vivo* et la migration cellulaire *in vitro* (Siamakpour-Reihani et al., 2011). Afin d'étudier la dynamique de la phosphorylation de la HTT, le FK506 pourrait être administré aux souris MMTV-PyVT. Enfin, des tumeurs provenant des souris mutantes pour la S421-P-HTT dans le modèle PyVT pourraient être greffées au sein d'une souris sauvage et inversement afin de différencier les effets intrinsèques et extrinsèques de cette phosphorylation sur le développement et la progression tumorale.

IV. Longues répétitions CAG et prévalence des cancers : un mal pour un bien ?

Deux études se sont intéressées à la prévalence des cancers chez les individus atteints de la MH. En 1999, une première étude avait estimé la prévalence des cancers chez 694 individus danois atteints de la MH et ayant survécu jusqu'à au moins 40 ans et 695 individus danois à risques ayant au moins 55 ans (Sorensen et al., 1999). La prévalence des cancers est significativement moindre chez les individus atteints de la MH (contrairement à leurs proches non atteints de la MH), et ce, pour tous les cancers sauf pour ceux de la cavité buccale et du pharynx. Les auteurs suggéraient alors qu'en entraînant ou en augmentant la mort cellulaire des cellules pré néoplasiques, la forme mutée de la HTT pourrait protéger de l'apparition des cancers. Treize années plus tard, une seconde étude s'intéressa à la prévalence des cancers chez des individus suédois atteints d'une de ces trois maladies dont l'origine est une répétition polyglutaminique anormale dans un gène cible : la MH, l'atrophie musculaire spinobulbaire et l'ataxie héréditaire (Ji et al., 2012). Chez les 1510 individus porteurs de la MH, la prévalence des cancers est plus faible par comparaison de population générale ou de leurs proches non atteints de la MH (sauf pour les cancers du système digestif). Les risques de faire des accidents vasculaires cérébraux ou encore de développer du diabète sont, quant à eux, similaires. Ces effets protecteurs sont observés pour les trois maladies, suggérant alors l'existence d'un mécanisme de protection contre le développement de cancer commun aux répétitions polyglutaminiques. Cependant, l'âge médian des décès des individus impliqués dans cette étude (64 ans) et d'une manière plus globale, l'âge précoce de décès des individus atteints de la MH, pourrait notamment participer à la faible prévalence des cancers dans ces populations. D'autre part, une autre étude de Sorensen et al. s'intéressant aux causes de décès des patients atteints de la MH avait observé que seulement 5% des décès chez les patients atteints de la MH était attribuable aux cancers, contre 31% chez les individus non atteints de la même fratrie (Sorensen and Fenger, 1992). Les auteurs n'ont pas eu accès à la longueur de la répétition CAG, ni aux caractéristiques clinicopathologiques (grade, métastase, survie) des cancers développés par les individus participant à ces études.

Dans notre étude concernant le polymorphisme des répétitions CAG de la *HTT* dans le cancer, nous nous sommes intéressés aux risques de cancer du sein et de l'ovaire chez des femmes porteuses de mutations *BRCA1* ou *BRCA2* (Article 2). Ces mutations confèrent un risque élevé de développer ces deux cancers. Ainsi, la population d'étude présentait déjà un contexte héréditaire de mutations germinales prédisposant à certains cancers. Nous avons observé que de longues répétitions n'entraînant pas la MH (<36 CAG) protégeaient contre l'apparition des cancers de l'ovaire tandis qu'aucun effet n'a été observé pour les cancers du sein. Comment expliquer la spécificité de l'association entre la longueur du CAG de la *HTT* et les effets observés ? Les longueurs des répétitions CAG semblent constantes chez les individus ayant développé un cancer du sein. Cependant l'expression de la *HTT* diffère en fonction du sous-type histologique, moléculaire ou encore du statut

métastatique. De plus, en condition normale et pathologique, l'expression de la HTT diffère en fonction des tissus et des sous types cellulaires au sein d'un même tissu (pour article de revue, (Moreira Sousa and Humbert, 2013)). Les différences d'expression de la HTT associées à la spécificité des voies de signalisation impliquées dans chaque pathologie pourraient expliquer que la HTT n'influence pas de la même façon tous les cancers. L'implication de la HTT pourrait ne pas se limiter au cancer du sein.

Dans le contexte de notre étude, les allèles longs et courts ont été préalablement définis comme présentant respectivement le plus grand et le plus petit nombre de répétitions CAG. Ainsi, lorsque la différence de nombre de répétitions entre les deux allèles est faible, il est difficile de distinguer l'effet de l'allèle le plus long de celui de l'allèle le plus court : si par exemple, le premier allèle 1 présente 20 CAG, aurait-il un effet majeur si le second allèle présente 19 répétitions et aucun effet s'il présente 21 répétitions ? Deux approches ont été utilisées : un modèle pour lequel les risques de cancer du sein et de l'ovaire ont été évalués séparément (modèle simple) et un second modèle où ces derniers ont été estimés simultanément (modèle en concurrence). Dans le modèle simple et dans le modèle en concurrence, la longueur de la répétition CAG, respectivement dans l'allèle le plus long et le plus court de la *HTT*, diminue significativement le risque de développer un cancer de l'ovaire. Le même effet protecteur est observé lorsque la moyenne de la longueur des répétitions des deux allèles est analysée (donnée non montrée). Nos résultats suggèrent donc que la longueur cumulative des deux allèles pourrait influencer l'âge d'apparition des cancers du sein chez ces femmes qui présentent des répétitions CAG n'entraînant pas la MH. Existe-t-il un seuil à partir duquel un des allèles de la *HTT* a un effet pénétrant, diminuant ainsi l'occurrence des cancers ?

De la même façon que la *HTT*, le récepteur aux androgènes contient dans l'exon 1 une répétition polymorphique de triplet CAG qui est liée, en fonction de sa longueur, soit à une augmentation du risque de cancer de la prostate, soit au développement d'une maladie neuromusculaire, l'atrophie spino-bulbaire et musculaire ou syndrome de Kennedy (SBMA, spinal and bulbar muscular atrophy ; pour article de revue, voir (Kumar et al., 2011)). La longueur de la répétition polyQ présente dans ce récepteur module son interaction avec ses corégulateurs transcriptionnels ; elle est inversement corrélée à la fonction de transactivation du récepteur et, donc, à son activité (Chamberlain et al., 1994). Lorsque cette répétition est inférieure à 20, le risque de cancer de la prostate augmente. Entre 20 et 40 répétitions, la physiologie de la protéine est normale ; cependant une répétition strictement supérieure à 40 répétitions entraîne le développement la SBMA. Enfin, une étude récente a mis en évidence que des répétitions ≥ 21 CAG augmentent le risque de développer un cancer du sein masculin et sont associées à la diminution de la survie chez les hommes ayant développé un cancer du sein (Song et al., 2012). Ainsi, comme c'est le cas pour la *HTT*, le polymorphisme CAG du récepteur aux androgènes semble être un facteur pronostic important de l'apparition et de l'évolution de certains cancers.

En plus de la MH, plusieurs études épidémiologiques se sont intéressées aux prévalences des cancers chez des individus atteints de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (MP) et d'Alzheimer (MA). Dans ces deux pathologies, l'occurrence de la plupart des cancers semble moindre (Bajaj et al., 2010; Ma et al., 2014). Cependant, dans le cas de la MP, le mélanome constitue une exception : cette maladie est associée à un risque accru de mélanomes en comparaison des individus non atteints de la MP et cette relation est réciproque (Liu et al., 2011). Cette spécificité s'expliquerait par le fait que les mélanomes et la MP partageraient des facteurs de risques communs : (1) environnementaux (les pesticides) ou (2) génétiques (phénotype cheveux roux) ou encore (3) des voies de signalisation pathogéniques communes en plus de leur origine embryonnaire semblable, les cellules de la crête neurale.

D'une manière globale, la disparité des voies de signalisation impliquées, d'une part, dans la prolifération cellulaire et donc dans la progression tumorale, et d'autre part, dans la neurodégénérescence et donc liées la mort cellulaire, pourrait expliquer la moindre prévalence de cancers chez les individus atteints de maladies neurodégénératives. Certains mécanismes communs induits par l'expression des protéines à répétitions CAG (notamment liés à la neurodégénérescence) pourraient expliquer l'effet protecteur contre le développement de cancer que peut conférer ce type de répétitions.

A l'inverse, de façon plus spécifique pour chaque maladie, le patron d'expression de chaque protéine présentant une répétition de triplet CAG, les spécificités de ses fonctions ainsi que les voies de signalisation et les acteurs impliqués dans la pathologie étudiée, pourraient expliquer les différents effets physiologiques qui peuvent être parfois opposés selon le contexte. Les études s'intéressant aux liens entre cancer et longueur de triplet CAG doivent être étendues, d'une part, à un plus grand nombre de patients, et d'autre part, à plusieurs types de cancers. Les expansions que nous avons observées sont-elles causales ou des conséquences de la progression tumorale ou encore des marqueurs de l'instabilité génétique ? De futures études s'appuyant sur des modèles cellulaires et murins et s'intéressant aux liens de causalité entre longueur de répétitions polyglutaminiques et cancer devraient permettre d'établir les mécanismes cellulaires à l'origine des phénotypes observés.

V. Implication du polymorphisme CAG de la *HTT* dans l'âge d'apparition des cancers

Chez des individus atteints de la MH, l'âge d'apparition des symptômes moteurs dépend de la longueur de la répétition CAG de l'allèle muté de la *HTT* (Lee et al., 2012a). Chez les individus hétérozygotes pour cette mutation de la *HTT*, aucune interaction entre l'allèle sauvage et l'allèle muté n'influence l'âge d'apparition des symptômes. L'expansion CAG de la *HTT* régule donc, de manière dominante, l'âge de diagnostic de la MH.

≤26 CAG	27-35 CAG	≥36 CAG
ALLELE DE LA HUNTINGTINE		
Normal	Intermédiaire	Maladie de Huntington Prévalence 36-39 sous-estimée ?
DEVELOPPEMENT DE CANCERS		
Risque de cancer de l'ovaire négativement associé au nombre de CAG		Prévalence réduite
AGE D'APPARITION DES CANCERS		
-	Age précoce	Age précoce ?
PROGRESSION METASTATIQUE		
Dans le groupe HER2, risque de développement de métastases augmente avec le nombre de CAG		Phénotype pro-métastatique

Figure 27 | La longueur de la répétition CAG et les cancers.

Tableau récapitulatif des variations de longueur de répétitions CAG de la *HTT* et des phénotypes associés.

Dans leur étude, Ji et al. ont utilisé l'âge au diagnostic de la MH comme référence dans leurs analyses statistiques, les longueurs des répétitions CAG ne leur étant pas accessibles (Ji et al., 2012). Chez les individus qui ont développé un cancer, les auteurs n'ont pas observé de corrélation entre l'âge de diagnostic des cancers et de la MH. Dans l'étude menée au laboratoire par Moreira Sousa et al. (Article 3, Moreira Sousa et al., 2013), nous avons eu accès à des échantillons tumoraux de 12 patientes atteintes de la MH et qui ont développé un cancer du sein. Etant donné le nombre faible d'échantillons analysés, il est impossible de conclure de manière statistique ; néanmoins chez ces 12 patientes, l'âge de diagnostic du cancer était inversement corrélé à la longueur de la répétition CAG de la *HTT*. De plus, dans un modèle murin de carcinogenèse mammaire, les souris modèles pour la MH développent des carcinomes mammaires plus précocement, démontrant une relation causale entre l'âge d'apparition de la maladie et le nombre de répétitions CAG (Figure 27).

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de relation linéaire entre âge au diagnostic du cancer et nombre de répétitions CAG dans la *HTT* parmi les femmes porteuses de mutations *BRCA1/2*. Cependant, parmi les femmes porteuses d'une mutation *BRCA1* qui ont développé un cancer du sein, celles présentant au moins un allèle ≥27 CAG développent leur cancer de façon significativement plus précoce (2,4 années plus tôt) que celles qui présentent des répétitions <27 CAG (l'âge moyen de cancer du sein dans cette population étant de 41 années). Nos résultats suggèrent que dans une gamme de répétitions CAG non pathologique par définition, il existe un effet seuil et non linéaire de la longueur de la répétition sur l'âge d'apparition des cancers (Figure 27). La présence d'un seul allèle intermédiaire dans la *HTT* aggraverait l'âge d'apparition.

VI. La répétition CAG de la *HTT* et les cancers HER2 : meilleurs amis ?

Nous avons montré que la HTT-m était impliquée dans le recyclage de HER2 (Article 3, Moreira Sousa et al., 2013) et que la longueur de la répétition CAG était un facteur prédictif indépendant du développement de métastases spécifiquement dans les carcinomes mammaires surexprimant HER2 (Article 2). Ainsi, bien que la HTT-m protège de l'apparition des cancers, lorsque ces derniers se développent, de longues répétitions CAG aggravent leur sévérité.

La HTT-m est impliquée dans l'accumulation de HER2 à la membrane plasmique des cellules mammaires tumorales (Article 3, Moreira Sousa et al., 2013). La forme mutante de la HTT, en interagissant de façon anormale avec la dynamine, essentielle au recyclage du récepteur HER2, favorise l'accumulation de ce dernier à la membrane plasmique des cellules. Cela entraîne l'activation des acteurs de cette voie de signalisation et un phénotype pro-TEM et pro-métastatique. Dans cette étude, les deux modèles murins utilisés (ErbB2 et PyVT) entraînent, tous deux, le développement d'une tumeur surexprimant HER2. Il serait intéressant de déterminer, par exemple dans des modèles indépendants de l'expression de HER2, si la HTT mutante module spécifiquement l'accumulation de HER2 à la membrane ou si la HTT mutante a le même effet sur d'autres récepteurs essentiels à la carcinogenèse, tel que le récepteur à l'EGF. En effet, le recyclage et la dégradation du récepteur à l'EGF sont altérés par la présence de la mutation polyQ de la HTT : la HTT-m modifie l'ubiquitination du récepteur de l'EGF et l'activation de sa voie de signalisation (Melone et al., 2013).

Dans un contexte où l'allèle de *HTT* n'est pas pathologique (<36 CAG), la longueur de la répétition prédit l'apparition des métastases spécifiquement dans le type moléculaire HER2 (Article 2). Ceci constitue un argument en faveur de la spécificité du type de récepteur régulé par la HTT. On peut imaginer que sa fonction dans la régulation du récepteur HER2 est dépendante de la longueur de la répétition CAG, que ce soit dans un contexte normal ou pathologique pour la MH.

Balda et al. ont montré que ZONAB régule l'expression de ErbB2 dans des cultures cellulaires par l'interaction entre ZONAB et ZO1 (Balda and Matter, 2000). Dans des cellules prolifératives, ZONAB se localise fortement au niveau nucléaire où il contrôle l'activité du promoteur de ErbB2 en interagissant avec ce dernier tandis que dans des cellules confluentes, ZONAB est absent du noyau. Il est possible qu'en plus de réguler le recyclage de ErbB2 à la membrane plasmique, la HTT participe à la régulation de ErbB2 par son interaction avec ZO1.

VII. L'instabilité des répétitions CAG de la *HTT* dans les cancers

Comme abordé précédemment (voir Chap.4, I.3), les répétitions CAG de la *HTT* sont instables, à la fois dans les lignées germinales, mais aussi dans les lignées somatiques. L'instabilité somatique

du nombre de répétitions CAG dans la *HTT* entraîne une variation du nombre de triplets d'une cellule à l'autre ou d'un tissu à l'autre. Elle est importante dans les zones affectées au cours de la MH, notamment dans le striatum, suggérant qu'elle participe à la spécificité de la neuropathologie de la MH (Telenius et al., 1994; De Rooij et al., 1995; Mangiarini et al., 1997). Ainsi, il est envisageable que l'instabilité somatique soit impliquée dans l'initiation et la progression tumorale.

Dans notre étude, le nombre de triplets CAG présent dans la *HTT* a été évalué dans les cellules sanguines des femmes porteuses de mutations *BRCA1/2* et dans des cellules tumorales primaires chez les individus ayant développé un cancer du sein sans contexte familial apparent (Article 2). Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'implication potentielle d'expansion somatique de la *HTT* dans la carcinogenèse mammaire. Cependant, lorsque nous avons déterminé la longueur des expansions de la *HTT* (Genoscreen, Article 2), aucun problème technique ne fut rencontré, ce qui aurait été le cas en présence d'une longueur très variable de CAG entre les cellules tumorales. Dans la mesure où l'échantillon analysé est bien représentatif de l'hétérogénéité tumorale, nos résultats suggèrent qu'au sein de la tumeur primaire, il n'existerait pas de mosaïsme important dans la longueur de la répétition CAG. Il serait très intéressant d'analyser la longueur de cette répétition dans les cellules saines et les cellules tumorales primaires, ainsi que dans les cellules tumorales circulantes et tumorales secondaires provenant d'un même individu. Les cellules tumorales métastatiques pourraient présenter une expansion de triplets CAG plus importante que les cellules tumorales primaires ce qui leur conférerait un avantage sélectif. D'autre part, les voies de signalisation à l'origine de l'instabilité somatique des répétitions CAG pourraient être semblables à celles impliquées dans l'instabilité génétique à l'origine de l'initiation et de la progression tumorale.

VIII. Les complices de la *HTT* dans les cancers

La *HTT* a de nombreux partenaires (voir Chap.4, II.4) dont certains sont impliqués dans la carcinogenèse mammaire. Le suppresseur de tumeur P53, par exemple, est retrouvé muté dans de nombreux carcinomes mammaires (Petitjean et al., 2007). HIP1 (huntingtin interacting protein 1), impliquée dans le transport vésiculaire, est surexprimée dans des adénocarcinomes tels que les cancers du sein, de l'ovaire, du côlon, de la prostate et des poumons (Rao et al., 2002). HIP1 agit en tant que facteur de survie et son expression est associée au développement de métastases et à un mauvais pronostic chez les hommes ayant développé un cancer de la prostate. HIP14 (huntingtin interacting protein 14) est un oncogène capable d'induire la formation de tumeurs chez la souris (Ducker et al., 2004). L'expression de HAP1 (huntingtin associated protein 1) est moindre dans les cancers du sein en comparaison du tissu mammaire non tumoral et sa surexpression entraîne une diminution de la migration et de l'invasion des cellules tumorales mammaires (Zhu et al., 2013).

La HTT pourrait donc participer à l'effet tumorigénique ou antitumorigénique induit par ses partenaires. Etudier le potentiel tumorigénique des partenaires de la HTT, en invalidant son expression ou en présence d'une HTT mutée, permettrait de tester cette hypothèse. Par exemple, lorsque la HTT est mutée, ses interactions avec HIP1 et HIP14 sont altérées (Gervais et al., 2002; Yanai et al., 2006).

La HTT-m favorise l'expression de P53 qui s'accumule dans des modèles murins et cellulaires de la MH et dans les cerveaux post-mortem d'individus atteints de la MH (Bae et al., 2005). La surexpression de P53 chez ces individus pourrait participer à la moindre incidence de cancers observés chez ces patients (Sorensen and Fenger, 1992; Sorensen et al., 1999; Ji et al., 2012).

IX. La prévalence de la MH est-elle sous-estimée ?

La prévalence de la MH est estimée entre 8 à 12.3 individus pour 100 000 (Tassicker et al., 2009; Morrison et al., 2011; Evans et al., 2013). Des études récentes suggèrent que cette prévalence pourrait être sous-estimée ; elle a été évaluée à 13.7 pour 100 000 dans la population générale et 17.3 pour 100 000 dans la population de type caucasien (Fisher and Hayden, 2014). Pour évaluer la prévalence de la MH, ces études utilisent des modèles d'estimation qui étendent les observations faites dans des sous-populations d'individus à risque (ou atteints de la MH) à la population générale. Ainsi, aucune étude n'a évalué la prévalence de la MH chez des individus en bonne santé qui ne présentent pas de risque connu de développer des maladies, infections etc.

Dans notre étude, alors que la distribution globale du nombre de répétitions CAG est comparable à celle qui est décrite dans la population générale, nous avons observé dans plusieurs cohortes indépendantes, une prévalence de porteurs de répétitions CAG ≥ 36 autour de 1 pour 500 individus (Article 2). Cette prévalence apparaît bien plus élevée que celle qui a été publiée précédemment. Comment pouvons-nous interpréter cette différence ? Il serait à priori possible que la prévalence d'expansion CAG ≥ 36 soit plus importante chez les individus ayant développé un cancer du sein. Ceci serait en quelque sorte en contradiction avec les études précédentes qui ont observé une incidence moindre des cancers chez les individus atteints de la MH (Sorensen and Fenger, 1992; Sorensen et al., 1999; Ji et al., 2012). Cependant, nous avons observé la même prévalence dans une population d'individus indépendante présentant des formes d'ataxies héréditaires (1:541). De manière similaire, Perlis et al. ont reporté une prévalence de porteurs de répétitions CAG ≥ 36 de 3 individus sur 1 000 dans une population d'individus déprimés (Perlis et al., 2010). Bien que la dépression soit un phénotype associé à la MH, ces résultats suggèrent que la prévalence d'expansion CAG ≥ 36 est sous-estimée et pourrait être plus de dix fois supérieure à celle décrite dans la littérature. Dans notre étude, les 5 individus porteurs de répétitions CAG ≥ 36 présentaient un

nombre de répétitions inférieur à 39, dans une gamme où la pénétrance de la MH est incomplète (Rubinsztein et al., 1996; McNeil et al., 1997). Ainsi, certains des porteurs de ces répétitions développent la MH alors que d'autres ne présentent pas de symptômes. A l'heure actuelle, le coefficient de pénétrance (c'est-à-dire le nombre d'individus atteints de la MH sur le nombre d'individus porteurs) dans cette gamme de répétitions, est très peu décrit. Il n'est pas possible de conclure quant à la prévalence de la MH dans cette gamme. Lorsqu'elle se développe, c'est généralement à un âge tardif où la neurodégénérescence observée est souvent confondue avec la neurodégénérescence classiquement observé chez des individus présentant un âge avancé (données Alexandra Dürr, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière). De futures études sont donc essentielles et devraient permettre de déterminer la prévalence de la MH dans la population générale. Ces répétitions sont instables dans les lignées germinales et se caractérisent par une anticipation génétique entraînant une augmentation du nombre de répétitions au cours des générations, plus important lors d'une transmission paternelle (Duyao et al., 1993).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Mes travaux de thèse ouvrent de nouvelles voies sur l'étude de la HTT dans un contexte non neuronal et une pathologie tout autre que la MH. Ils ont mis en évidence un rôle clé de la HTT au-delà du cerveau, au cours de la progression tumorale mammaire mais aussi lors du développement mammaire. Ces travaux devraient conduire à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de métastases mais aussi dans celui des glandes mammaires saines.

Ces études soulignent la richesse de la complémentarité que représente l'étude des rôles des protéines (comme la HTT ou encore le récepteur aux androgènes), dans divers contextes pathologiques – ici entre cancers et maladies neurodégénératives. Nous avons mis en valeur un rôle important de la HTT dans la régulation des jonctions intercellulaires et notamment d'un des marqueurs des jonctions serrées, ZO1, dans les cellules néoplasiques mammaires. Cette fonction pourrait jouer un rôle primordial au cours de la neurogenèse embryonnaire – l'adhésion des neurones à leur substrat ainsi que la polarité étant essentielles à la formation d'un réseau neuronal fonctionnel et complexe. Comme nous l'avons décrit dans ce manuscrit, la fonction de la HTT au cours de la division cellulaire, initialement décrite dans les cellules neuronales, est conservée dans les cellules mammaires comme dans le développement du cortex, et a des conséquences fonctionnelles sur le développement normal de la glande mammaire. Les rôles de la HTT dans la division cellulaire et dans l'adhésion intercellulaire pourraient être conservés dans l'ensemble des tissus où la HTT est exprimée. L'implication de la HTT ne se limite donc clairement pas à la physiologie normale d'un seul tissu ni à une seule et unique pathologie, mais peut s'étendre à d'autres maladies.

A l'heure actuelle, les cancers et les maladies neurodégénératives sont deux problèmes majeurs de santé publique. Les domaines de recherche - s'intéressant d'une part aux cancers et d'autre part à la neurodégénérescence pathologique - ne sont que très peu associés et souvent étudiés de façon exclusive. Certaines voies de signalisation impliquées dans ces pathologies peuvent être opposées mais aussi, dans certains cas, similaires. Une recherche interdisciplinaire entre ces deux domaines permet de confronter et d'échanger des connaissances, notamment sur les dysfonctions à l'origine de ces pathologies. Ainsi, il est nécessaire d'orienter les études vers une recherche interdisciplinaire et multicentrique afin de mieux appréhender les différences et les similitudes partagées par ces pathologies. Comprendre la diversité des rôles de protéines, telles que la HTT ou encore le récepteur aux androgènes, dans différents contextes, permettra une meilleure compréhension des mécanismes clés à l'origine de la protection contre le cancer et des maladies neurodégénératives mais aussi ceux impliqués dans la sévérité de ces pathologies.

ANNEXES

Article 3. La HTT mutante dans le cancer du sein

“ The Huntington disease protein accelerates breast tumour development and metastasis through ErbB2/HER2 signalling ”

**Cristovao Moreira Sousa, John Russel McGuire, Morgane S. Thion,
David Gentien, Pierre de la Grange, Sophie Tézenas du Montcel, Sophie Vacher,
Anne Vincent-Salomon, Alexandra Durr and Sandrine Humbert**

EMBO Molecular Medicine, 2013, 5(2):309-25

Un étudiant en thèse dans notre laboratoire, Cristovao Moreira Sousa, s’est intéressé à l’influence de la HTT mutée dans le cancer du sein (Moreira Sousa et al., 2013). J’ai participé à cette étude en contribuant aux expériences de motilité, d’invasion et d’anoïkis et à leurs analyses ainsi qu’à l’étude de l’internalisation du récepteur HER2 dans des modèles cellulaires.

Tout d’abord, nous nous sommes demandé si les cancers du sein développés chez les patientes atteintes de la MH pouvaient présenter certaines spécificités. Etant donné la rareté de la MH, la prévalence des patientes atteintes de la MH qui ont développé un cancer du sein au cours de leur vie est encore plus rare. Nous avons tout de même eu accès aux informations clinicopathologiques de 12 patientes ayant eu à la fois un cancer du sein mais aussi la MH. Chez ces 12 patientes, l’âge de diagnostic du cancer était inversement corrélé à la longueur de la répétition CAG. Des marquages immunohistochimiques contre la HTT sur ces biopsies ont permis de confirmer l’expression de la polyQ dans des tumeurs mammaires humaines.

Par la suite, afin d’étudier l’influence de la forme mutée de la HTT sur la carcinogenèse mammaire *in vivo*, des modèles murins de cancer du sein (ERBB2 et PyVT) ont été croisés avec un modèle murin de la MH. Les carcinomes des souris exprimant la forme mutée de la HTT apparaissent précocement par comparaison avec ceux exprimant une HTT sauvage ; les souris hétérozygotes pour la mutation de la HTT présentent un phénotype intermédiaire. La progression tumorale des souris HTT-m est plus rapide comme révélé par un marquage immunohistochimique Ki67 sur les tumeurs. Histologiquement, les tumeurs exprimant la HTT-m semblent moins différenciées qu’en situation contrôle.

L'analyse de l'expression transcriptionnelle par puce à ADN a été réalisée sur ces tumeurs et 171 gènes codant des protéines connues présentaient une différence d'expression d'au moins 1.5 entre les tumeurs sauvages et les tumeurs exprimant la HTT-m. Une analyse des voies de signalisation les plus altérées a révélé des modifications de l'adhésion, de la réponse immunitaire, de la migration, et de l'organisation de la matrice extracellulaire. Tous ces processus sont indispensables au processus métastatique. De nombreuses protéines associées à la TEM telles que les MMP2, MMP3 sont surexprimées dans les tumeurs mutantes. Le profil d'expression génétique des tumeurs portant une HTT-m montre donc une surexpression de gènes impliqués dans l'invasion et la métastase. Fait intéressant, dans les tumeurs exprimant la HTT-m, celle-ci présente des taux d'expression transcriptionnels et protéiques moindres que la HTT sauvage, indiquant qu'en plus d'un gain de fonction toxique, une perte de fonction pourrait participer aux phénotypes observés.

Comme indiqué par l'analyse transcriptionnelle des tumeurs murines mammaires, une diminution des protéines d'adhésion, E-cadhérine, β -caténine, ainsi qu'une augmentation des marqueurs mésenchymateux tels que AML a été observée sur les tumeurs exprimant la HTT-m en comparaison des contrôles par immunohistochimie et western blot. Dans des lignées cellulaires primaires dérivées à partir de ces tumeurs, la forme mutée de la HTT entraîne une TEM partielle, avec une diminution des marqueurs d'adhésion et une augmentation des capacités migratoires, d'invasion et de résistance à l'anoïkis des cellules tumorales.

Pour étudier *in vivo* les effets de la HTT-m sur la dissémination métastatique, les métastases des poumons des souris PyVT ont été énumérées et elles sont plus nombreuses lorsque la HTT est mutante. La même observation a été faite sur des souris immunodéficientes greffées avec des tumeurs mammaires de souris mutantes pour lesquelles la croissance tumorale est similaire. Ainsi, l'expression de la forme mutée de la HTT favorise la TEM et la colonisation des métastases pulmonaires chez les souris.

Comment la HTT mutée favorise-t-elle la progression et la dissémination métastatique ? L'oncogène ERBB2/HER2 (souris/homme) s'accumule dans les tumeurs exprimant la HTT-m au niveau protéique, particulièrement au niveau membranaire (pas de modification de son expression transcriptionnelle). Cette accumulation conduit à une activation des voies de signalisation en amont telle que la voie AKT. Etant donné le rôle de la HTT dans les dynamiques intracellulaires, nous avons postulé que la HTT mutante pourrait modifier la dynamique intracellulaire de ERBB2. Pour tester cette hypothèse, des cellules tumorales humaines surexprimant HER2, les cellules SKBR3, ont été traitées avec un stimulateur de l'internalisation de HER2, la geldanamycine, qui entraîne l'endocytose de HER2 par l'intermédiaire de la dynamine. Alors que le traitement permet de diminuer la localisation membranaire de HER2 lorsque la HTT sauvage est exprimée, HER2 reste à la

membrane plasmique en présence de la forme mutée de la HTT, indiquant en effet que la HTT-m altère l'internalisation de HER2 de la membrane plasmique vers le compartiment intracellulaire.

L'expression exogène de la dynamine sauvage dans les SKBR3 diminue la quantité de HER2 présent à la membrane plasmique lorsqu'elle est co-exprimée avec la HTT sauvage, cependant cet effet est partiellement inhibé en présence de HTT mutée. Au niveau cellulaire, l'interaction entre la dynamine et la HTT est impliquée : la HTT-m, en interagissant de manière plus importante avec la dynamine que la forme sauvage de la HTT, la séquestre dans le compartiment cytoplasmique. Cela diminue la quantité de dynamine disponible nécessaire au recyclage du récepteur HER2 et provoque alors une accumulation de ce dernier à la membrane. L'activation consécutive de sa voie de signalisation explique l'augmentation des capacités de migration et d'invasion ainsi que de prolifération des cellules tumorales exprimant la HTT-m.

Enfin, un traitement des cellules tumorales primaires exprimant le HTT-m au trastuzumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur HER2 et permettant d'inhiber son action, inhibe l'accumulation de HER2 à la membrane plasmique et l'activation subséquente d'AKT et diminue la migration et l'invasion des cellules tumorales ainsi que leur prolifération *in vitro*.

En conclusion, cette étude a mis en évidence un rôle aggravateur de la forme mutée de la HTT dans l'agressivité des cancers du sein. La HTT-m accélère l'apparition ainsi que la progression tumorale et entraîne des dérégulations transcriptionnelles caractéristiques d'une activation et d'une surexpression des gènes impliqués dans l'invasion et le processus métastatique. En effet, la HTT mutante favorise la formation de métastases. Au niveau cellulaire, la HTT-m altère l'endocytose du récepteur HER2 conduisant à son accumulation à la membrane et à l'activation subséquente de ses voies de signalisations impliquées dans la migration et la prolifération.

The Huntington disease protein accelerates breast tumour development and metastasis through ErbB2/HER2 signalling

Cristovão Moreira Sousa^{1,2,3}, John Russel McGuire^{1,2,3}, Morgane Sonia Thion^{1,2,3}, David Gentien^{1,4}, Pierre de la Grange⁵, Sophie Tezenas du Montcel^{6,7}, Anne Vincent-Salomon^{1,8,9}, Alexandra Durr^{10,11,12,13}, Sandrine Humbert^{1,2,3*}

Keywords: breast cancer; dynamin; huntingtin; migration; polyglutamine

DOI 10.1002/emmm.201201546

Received May 07, 2012

Revised November 19, 2012

Accepted November 21, 2012

In Huntington disease (HD), polyglutamine expansion in the huntingtin protein causes specific neuronal death. The consequences of the presence of mutant huntingtin in other tissues are less well understood. Here we propose that mutant huntingtin influences breast cancer progression. Indeed, we show that mammary tumours appear earlier in mouse breast cancer models expressing mutant huntingtin as compared to control mice expressing wild-type huntingtin. Tumours bearing mutant huntingtin have a modified gene expression pattern that reflects enhanced aggressiveness with the overexpression of genes favouring invasion and metastasis. In agreement, mutant huntingtin accelerates epithelial to mesenchymal transition and enhances cell motility and invasion. Also, lung metastasis is higher in HD conditions than in control mice. Finally, we report that in HD, the dynamin dependent endocytosis of the ErbB2/HER2 receptor tyrosine kinase is reduced. This leads to its accumulation and to subsequent increases in cell motility and proliferation. Our study may thus have important implications for both cancer and HD.

- (1) Institut Curie, Paris, France
- (2) CNRS UMR 3306, Orsay, France
- (3) INSERM U1005, Orsay, France
- (4) Department of Translational Research, Paris, France
- (5) GenoSplice Technology, Institut Universitaire d'hématologie, Paris, France
- (6) AP-HP, Charles-Foix Clinical Research Unit, Department of Biostatistics and Medical Informatics, Hôpital de la Salpêtrière, University Pierre et Marie Curie, Paris, France
- (7) ER4, Modelling in Clinical Research, University Pierre et Marie Curie, Paris, France
- (8) Department of Pathology, Paris, France
- (9) INSERM U830, Paris, France
- (10) Département de Génétique et Cytogénétique, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, University Pierre et Marie Curie, UMR-S975, Paris, France
- (11) INSERM U975, Département de Génétique et Cytogénétique, Paris, France
- (12) CNRS UMR 7225, Département de Génétique et Cytogénétique, Paris, France
- (13) AP-HP, Département de Génétique et Cytogénétique, Hôpital de la Salpêtrière, Paris, France

*Corresponding author: Tel: +33 1 69 86 30 69; Fax: +33 1 69 86 30 92; E-mail: sandrine.humbert@curie.fr

INTRODUCTION

The bulk of interest in the huntingtin protein has centred on the fact that, when mutated, huntingtin causes Huntington's disease (HD), a devastating neurodegenerative disorder. The mutation is an abnormally expanded polyglutamine (polyQ) stretch in the N-terminus of the protein. Given the adult onset and dysfunction and death of adult neurons that characterizes HD, most studies have focused on the toxic effects elicited by polyQ-huntingtin in post-mitotic neurons. However, HD is also associated with peripheral manifestations including weight loss and muscle wasting (Sassone et al, 2009; van der Burg et al, 2009). These symptoms may not be linked only to secondary manifestations of neuronal dysfunctions but also to the presence of polyQ-huntingtin in other dysfunctioning tissues. Indeed, the protein is ubiquitous, with high levels produced by the brain and outside the nervous system (Trottier et al, 1995). At the subcellular level, huntingtin is found both in the cytoplasm and in the nucleus (Hoogeveen et al, 1993; Kegel et al, 2002; Trottier et al, 1995). It associates with various organelles and structures, such as clathrin-

coated vesicles, endosomal and endoplasmic compartments, mitochondria and microtubules. Consistent with this sub-cellular localization, huntingtin interacts with proteins involved in gene expression, intracellular transport, intracellular signalling and metabolism and thus appears to be involved in various cellular functions (Harjes & Wanker, 2003; Li & Li, 2004). Indeed, it is established that huntingtin plays critical roles in transcription, endocytosis, microtubule-based transport of organelles and mitosis in both neuronal and non-neuronal cells (Gauthier et al, 2004; Godin et al, 2010; Zuccato et al, 2010).

The presence of huntingtin in several tissues and its involvement in fundamental biological processes strongly suggest that huntingtin could be essential outside the brain. This is further underlined by the indispensability of huntingtin as revealed by the early embryonic lethality at day 7.5 of the complete knock-out of the huntingtin gene in mouse (Duyao et al, 1995; Nasir et al, 1995; White et al, 1997; Zeitlin et al, 1995). A partial depletion of huntingtin specifically showed its requirement for the generation of the three lineages that derived from the epiblast and lead to the formation of mesoderm, endoderm and ectoderm during gastrulation (Woda et al, 2005). Finally, huntingtin is required for the generation and expansion of haematopoietic cells in mouse and zebrafish (Lumsden et al, 2007; Metzler et al, 2000).

PolyQ-huntingtin induces death of neurons in the brain via distinct but complementary pathways including deregulation of apoptosis and/or autophagy, altered transcription, metabolism and cellular stress responses (Borrell-Pages et al, 2006; Zuccato et al, 2010). These disturbances were originally mostly attributed to the gain of new toxic functions of polyQ-huntingtin. However, there is growing evidence that loss of the normal functions of wild-type huntingtin could act concomitantly and synergistically with the gain of new toxic functions. For example, huntingtin function in the microtubule (MT)-based transport of brain derived neurotrophic factor (BDNF) vesicles is lost in HD, leading to a decreased trophic support provided by the cortical neurons to the striatal neurons (Gauthier et al, 2004). Thus, mutant huntingtin affects biological processes shared by all cells in the organism and this may impact on the homeostasis of the tissues where it is expressed.

Similarly, given the broad expression and basic cellular functions of wild-type huntingtin, it seems likely that mutant huntingtin may affect the aetiology of other diseases. Here we investigated whether mutant huntingtin could influence the progression of breast cancer after we found the protein to be expressed in both normal mammary epithelia and tumours. We demonstrate that mutant huntingtin accelerates tumourigenesis in two mouse breast cancer models, increases epithelial–mesenchymal transition (EMT) of cancer cells and favours lung metastasis in mice. Further analyses support that this occurs, at least in part, through the hyperactivation of the ErbB2/HER2 pathway. We thus propose a link between molecular pathways underlying neurodegeneration, cancer tumourigenesis and metastasis through mutant huntingtin.

RESULTS

Mutant huntingtin is expressed in human breast tumours

While research on HD has mostly focused on neurological symptoms, we investigated whether breast cancer could be influenced by the expression of mutant huntingtin. We identified 12 HD patients with breast cancer (Supporting Information Fig S1A). An inverse correlation between the length of the abnormal CAG expansion and the age at symptom onset in HD has been documented (Zoghbi & Orr, 2000). We also found a relationship between earlier ages of breast cancer onset and longer CAG repeats (Supporting Information Fig S1B; Pearson correlation coefficient = -0.58 , p -value = 0.04).

We had access to cancer biopsies from HD patients and used immunohistochemistry with an antibody recognizing both the wild-type and mutant forms of huntingtin (Supporting Information Fig S1C). Positive staining was observed in normal residual tissue and invasive cells. We also used a mutant specific antibody (Supporting Information Fig S1D) and found mutant huntingtin in normal residual tissue and invasive cells with a strong nuclear staining. Thus, mutant huntingtin is expressed in breast tumours where it may influence cancer progression.

PolyQ-huntingtin promotes mammary carcinogenesis

We then generated mice that express the activated polyomavirus middle T antigen (PyVT) oncogene and polyQ-huntingtin. Expression of PyVT under the control of the mouse mammary tumour virus (MMTV) promoter induces mammary adenocarcinoma formation (Guy et al, 1992). MMTV-PyVT mice were crossed with an HD mouse model, the *Hdh*^{Q111/Q111} mouse line which carries an abnormal 111 CAG repeat expansion in the huntingtin gene encoding an abnormally expanded polyQ stretch in huntingtin (Wheeler et al, 1999). HD behavioural and motor phenotypes arise much later than PyVT-induced cancer in these mice (Menalled et al, 2009). Compared with MMTV-PyVT mice expressing wild-type huntingtin (MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7}), tumours appeared earlier in MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} mice (Fig 1A). Heterozygous MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q111} mice exhibited an intermediate phenotype. Examination of whole-mount mammary glands from virgin female MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} mice at 8, 12 and 14 weeks (Fig 1B) revealed larger mammary adenocarcinomas than in the huntingtin heterozygous condition, themselves larger than those produced in the wild-type background at the same age. From these stainings, we evaluated the tumour progression by determining the percentage of the mammary gland composed of tumoural tissue at different time points (Fig 1C). Tumour progression was increased in MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} mice as compared to MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q111} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} mice. These results were further confirmed by haematoxylin and eosin staining analysis (4th mammary gland at 14 weeks of age; Fig 1D). Mammary tumours in the wild-type mice were more differentiated than those in the polyQ situation. In the heterozygous situation, the situation was intermediate.

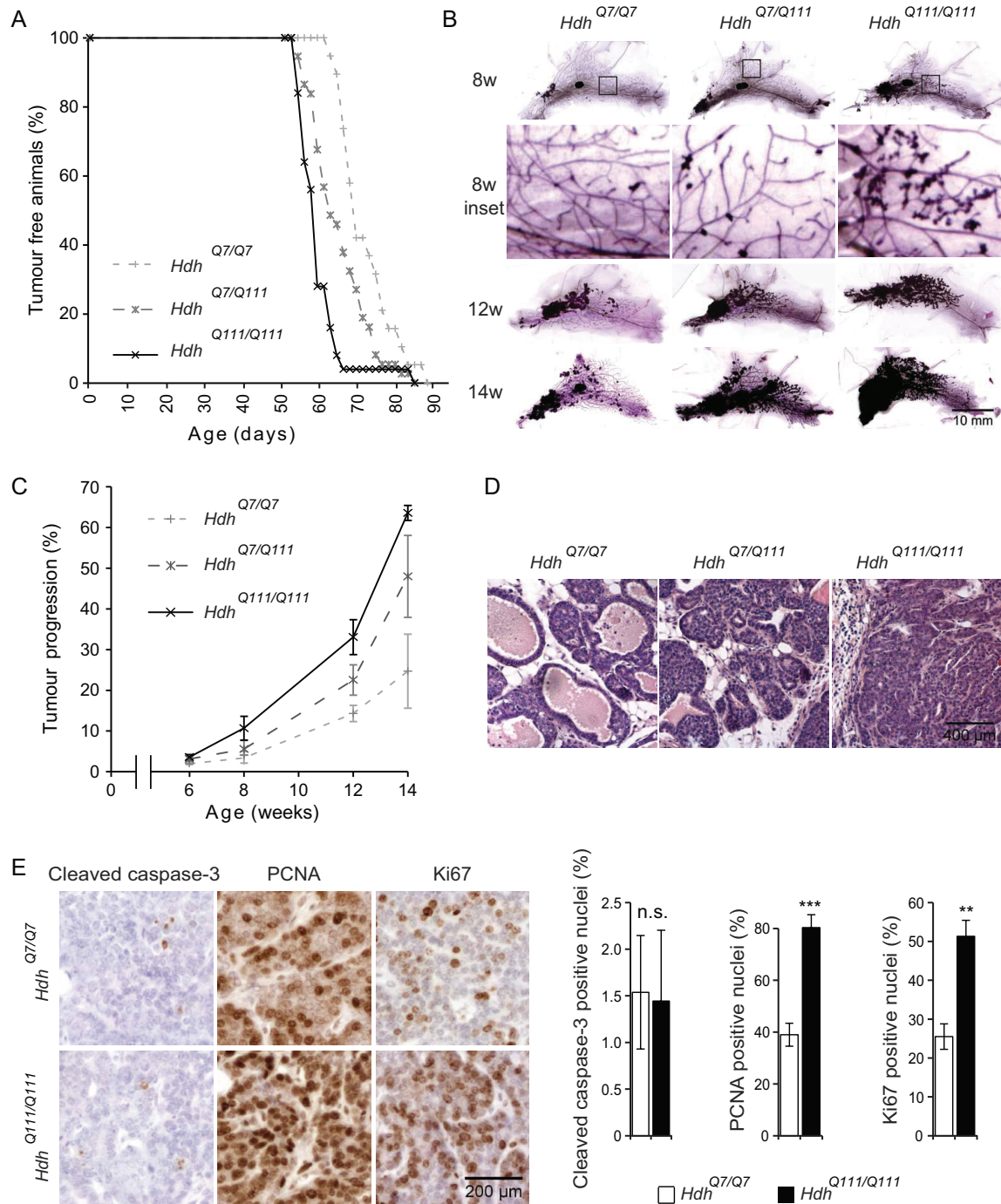


Figure 1. Oncogene-induced mammary tumours develop faster in HD mice.

- A.** Tumour-free survival curves of MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} (*Hdh*^{Q7/Q7}; $t_{50} = 65 \pm 1$ days; $n = 19$), MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q111} (*Hdh*^{Q7/Q111}; $t_{50} = 62 \pm 4$ days; $n = 37$) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} (*Hdh*^{Q111/Q111}; $t_{50} = 52 \pm 2$ days; $n = 25$) mice. Kaplan–Meier Analysis, Logrank test: p -value < 0.0001 .
- B.** Whole mount carmine aluminium staining of MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7}, MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q111} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} abdominal mammary glands at 8, 12 and 14 weeks.
- C.** Percentage of tumoural tissue evaluated on whole mount carmine aluminium staining (at least $n = 3$ mice per genotype and per time point). At 14 weeks, MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} versus MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q111}: p -value = 0.0186; MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} versus MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111}: p -value = 0.0024; MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q111} versus MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111}: p -value = 0.1558.
- D.** Hematoxylin and eosin staining of sections from MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7}, MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q111} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours (4th mammary gland, 14 weeks).
- E.** Immunohistochemical staining of sections from MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours (4th mammary gland, 14 weeks) with antibodies against cleaved caspase-3, PCNA and Ki67. The graphs represent the quantitative assessments of the percentage of cleaved caspase-3 (p -value = 0.3583), PCNA (** p -value = 0.0010) and Ki67 (** p -value = 0.0080) positive cells (three tumours per genotype, at least 1000 cells scored per condition). n.s., not significant.

We tested whether the effect on tumour growth could result from changes in apoptosis and cellular proliferation by immunohistochemistry. Apoptosis detected by cleaved caspase-3 immunohistochemistry was similar in MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} mammary tumour as compared to control (Fig 1E). In contrast, the protein levels of proliferation markers proliferating cell nuclear antigen protein (PCNA) and Ki67 were markedly higher in MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours.

Similar results were obtained when breeding HD mice with the MMTV-ErbB2 mouse breast cancer model (neu/HER2; Supporting Information Fig S2A and B; Muller et al, 1988). Thus, the presence of polyQ-huntingtin accelerates cell proliferation and mammary carcinogenesis in two breast cancer models.

PolyQ-huntingtin induces gene expression changes in PyVT mammary tumours

To decipher the molecular events that lead to the increased tumorigenesis associated with polyQ-huntingtin expression, we examined the gene expression patterns of MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} mammary tumours using Affymetrix Mouse Exon 1.0 ST microarrays (Fig 2). Out of 43,379 genes analysed in four samples of each type of tumour, 416 genes were found to be differentially regulated with fold differences of at least 1.5 (p -value < 0.05), and 171 of these encoded a known protein (Fig 2A and Supporting Information Table S1). Most of the genes affected by polyQ-huntingtin expression (73%) were up-regulated in the tumours expressing polyQ-huntingtin compared to their expression levels in the wild-type tumours (Supporting Information Fig S3A and Table S1). Hierarchical clustering analysis of regulated genes confirmed that the tumour samples could be assigned to two primary clusters of tumours (Fig. 2 and Supporting Information Fig S3A). The left group of the dendrogram contained the control tumour samples and the right group the HD tumour samples, with replicates in each cluster demonstrating substantial expression pattern homogeneity.

We confirmed the results generated by the gene microarrays for a subset of genes involved in relevant pathways (Supporting Information Fig S3B). The differences in the mRNA levels of cadherin 11, BRCA1-associated RING domain protein (BARD-1), matrix metalloproteinase 3 (MMP3), cyclin D2 were reflected by corresponding differences in the protein level as revealed by immunoblotting. Remarkably, mutant huntingtin mRNA (FC = -1.56; p -value = 4.7×10^{-4}) were lower than those of wild-type huntingtin. Analysis of the levels of huntingtin transcripts by quantitative real-time RT-PCR in MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} breast tumours confirmed this observation (Fig 2E). Furthermore, the decreased

levels of mutant huntingtin transcripts were accompanied by a decrease of mutant huntingtin protein levels as compared to the wild-type situation (Supporting Information Fig S4A), suggesting that concomitantly to the presence of the abnormal polyQ-huntingtin, reduced levels of the wild-type protein could also participate in the increased tumourigenesis in HD.

We then performed unsupervised analysis and pathway enrichment studies using all Gene Ontology (GO) terms (Supporting Information Table S2). The GO terms immune response (GO:0006955), adhesion (GO:0022610; GO:0007155), extracellular matrix organization (GO:0030198) and locomotion (GO:0040011) appeared dysregulated with p -values smaller than 10^{-4} . All of these pathways are known to participate in tumour progression. In agreement with the earlier appearance of the tumours expressing mutant huntingtin as compared to the one expressing wild-type huntingtin, the biological processes of several GO categories related to cell death, apoptosis and proliferation were also affected (p -values smaller than 5×10^{-2}). We confirmed these observations using hierarchical clustering and found changes in the levels of 67 mRNAs from genes associated with such functions as extracellular matrix remodelling, cytoskeleton organization and cellular death and proliferation (Fig 2B–D).

Thus the genetic signature of tumours expressing polyQ-huntingtin may correlate with their earlier appearance as compared to the one of tumours expressing wild-type huntingtin. Furthermore, this signature of overexpressed invasion and metastasis genes suggests enhanced aggressiveness of HD tumours.

PolyQ-huntingtin increases EMT and pulmonary metastasis

Microarray data revealed that mesenchymal-associated genes and genes encoding extracellular matrix ECM remodelling proteins associated with EMT were up-regulated in the polyQ-huntingtin-expressing tumours as compared to control tumours, including the genes MMP2 (FC = 1.66; p -value = 3.92×10^{-3}) and MMP3 (FC = 2.47; p -value = 1.58×10^{-2} ; Supporting Information Table S1). We also compared our microarray data to a multi-cancer stage-associated gene expression signature enriched in EMT markers (Cheng et al, 2012; Kim et al, 2010). Among the 64 genes corresponding to the top 100 probe sets of the signature, we found 31% of them to be significantly upregulated in HD conditions (Supporting Information Table S3). This suggested that EMT could be accelerated in HD during tumour progression.

To test this hypothesis, we analysed primary tumour sections by immunohistochemistry (Fig 3A). Lowered levels of the cell-cell adhesion proteins E-cadherin and β -catenin were

Figure 2. PolyQ-huntingtin causes differential gene expression in tumours.

- Venn diagram for genes found to be regulated using Mouse Exon 1.0 ST Affymetrix array chips in 4 MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} versus 4 MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} tumours (6 weeks after detection), which met the criteria of a p -value < 0.05 and a fold-change of more than 1.5.
- Hierarchical clustering for ECM remodelling (B), cytoskeleton associated (C), and proliferation/cell death genes (D). WT: MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} tumours; polyQ: MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours.
- mRNA levels of huntingtin as determined by quantitative PCR analysis in 4 MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and 3 MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours (p -value = 0.0165).

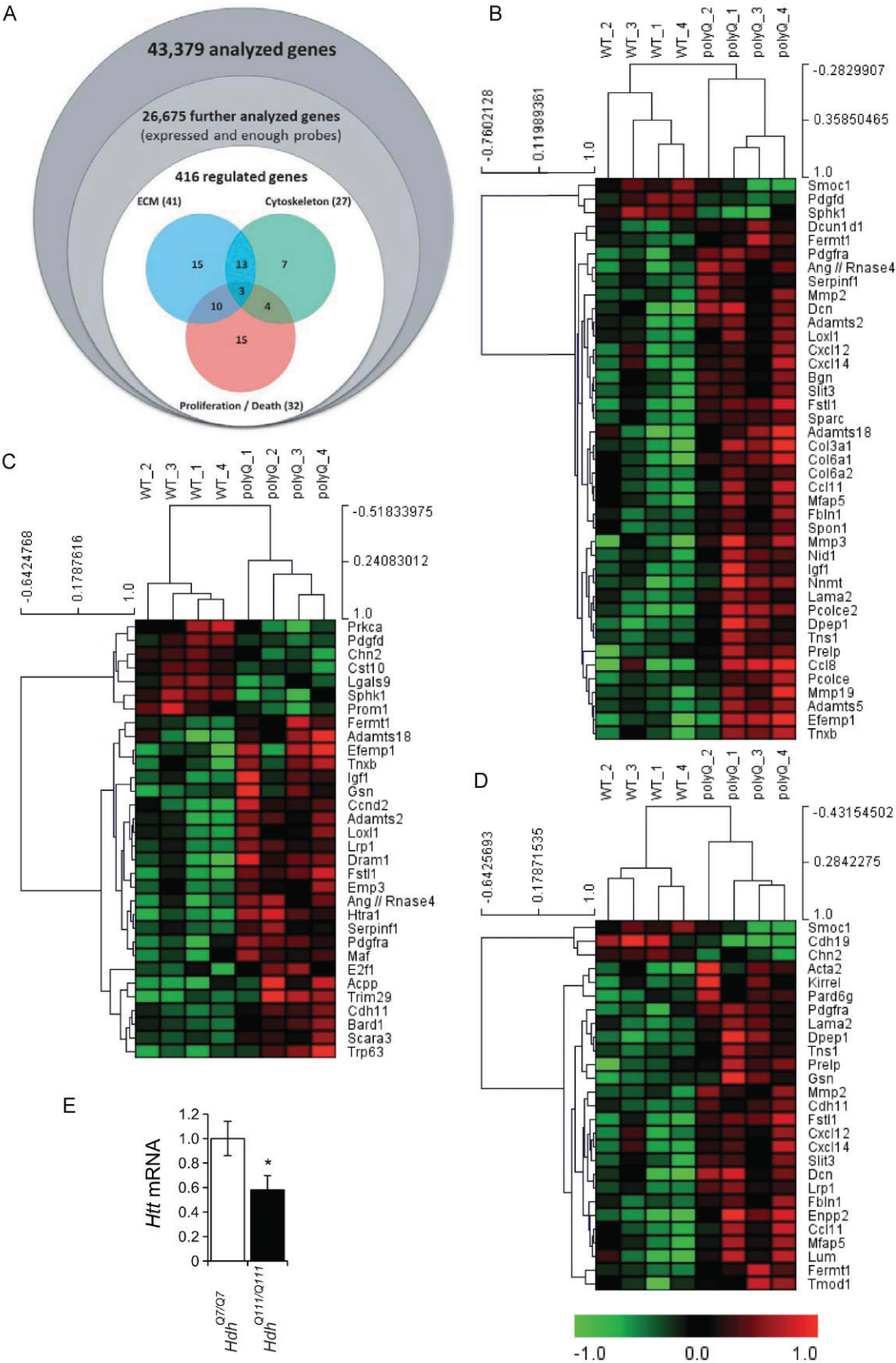


Figure 2.

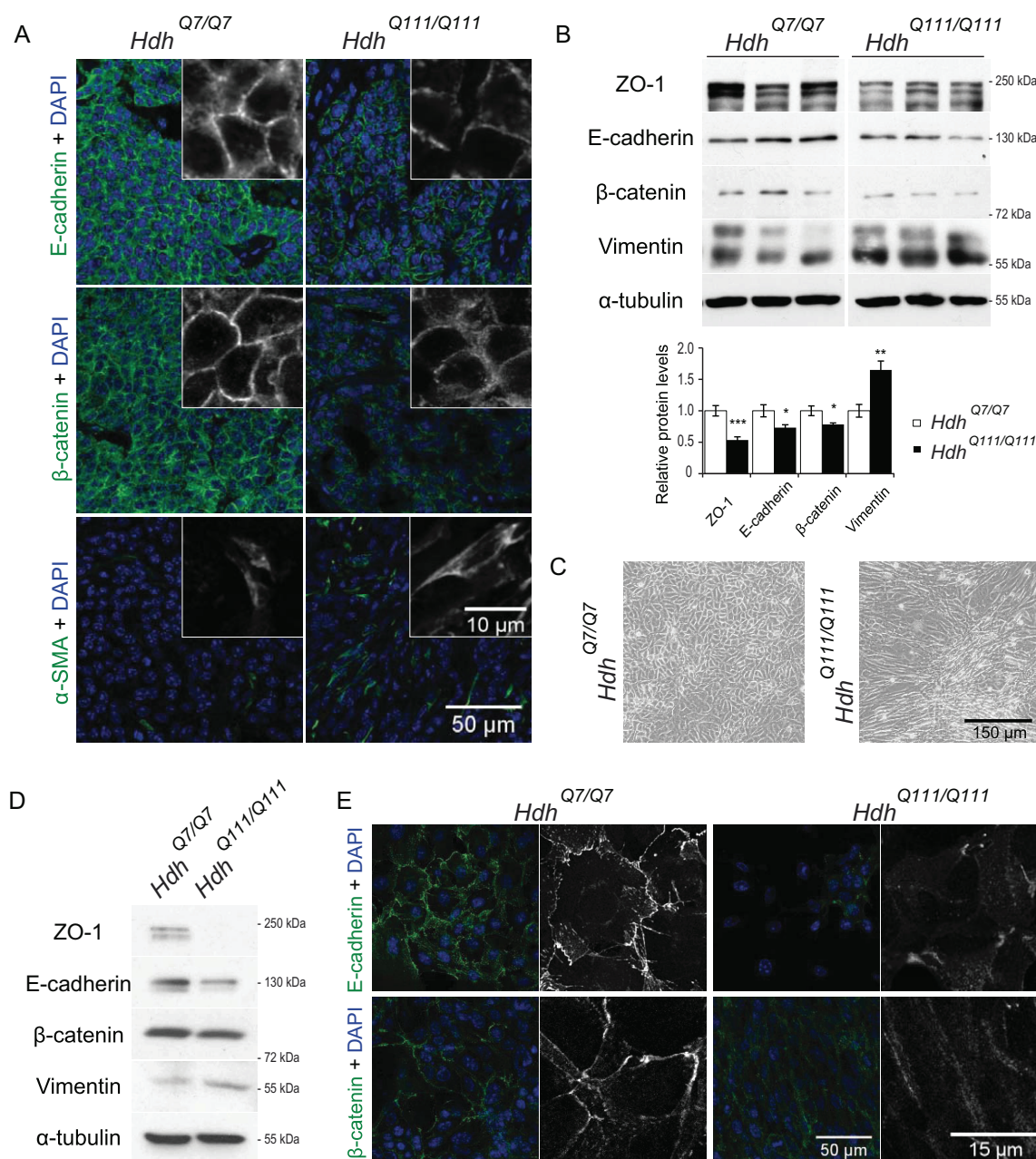


Figure 3. PolyQ-huntingtin accelerates EMT.

- A.** Immunostaining of sections from MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} (*Hdh*^{Q7/Q7}) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} (*Hdh*^{Q111/Q111}) tumours (originating from the 3rd mammary gland, 14 weeks) for endogenous E-cadherin, β-catenin and α-SMA.
- B.** Immunoblotting of total extracts from MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours (originating from the 3rd mammary gland, 14 weeks, *n* = 6 tumours per genotype, two independent immunoblotting) for the presence of ZO-1, E-cadherin, β-catenin, vimentin and α-tubulin. ZO-1: ****p*-value = 0.0007; E-cadherin: **p*-value = 0.0295; β-catenin: **p*-value = 0.0238; vimentin: ***p*-value = 0.0039.
- C.** Differential interfering contrast images of cells from MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} dissociated tumours.
- D.** Immunoblotting of extracts from PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells as in (B).
- E.** PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells are immunostained for endogenous E-cadherin and β-catenin.

observed in the MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours, while the mesenchymal marker α-smooth muscle actin (α-SMA) was increased. We then analysed extracts from MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours by immuno-

blotting (Fig 3B). The MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours had lower levels of the tight junction protein zonula occludens 1 (ZO1), E-cadherin and β-catenin, and an increased level of the mesenchymal marker vimentin compared to MMTV-PyVT/

Hdh^{Q7/Q7} tumours. Similarly, E-cadherin, β -catenin and vimentin levels were affected in MMTV-ErbB2/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours as compared to MMTV-ErbB2/*Hdh*^{Q7/Q7} tumours (Supporting Information Fig S2C). We next derived primary tumour cells from the MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours (PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111}, respectively). Doubling-time measurements showed no significant difference between wild-type (PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7}) and polyQ-huntingtin-expressing cells (PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111}) (12.38 ± 0.25 h and 12.65 ± 0.22 h, respectively, PLSD Fisher test p -value = 0.4357). However, further confirming the microarray data, polyQ-huntingtin expression led to a mesenchymal-like phenotype in the PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells, which became scattered and elongated compared to phenotype of the PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} cells (Fig 3C). Also, the observations done on tumours with respect to the levels of ZO1, E-cadherin, β -catenin and vimentin were confirmed in an immunoblot analysis of extracts from PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumour cells (Fig 3D). Immunostaining confirmed that E-cadherin and β -catenin production were substantially lower in polyQ-huntingtin-expressing cells (Fig 3E). Furthermore, β -catenin exhibited membrane localization in PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} cells and diffuse cytoplasmic localization in PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells, which is consistent with decreased cellular adhesion. In summary, mutant huntingtin expression in primary tumour tissue and in tumour-derived cells affects the levels of known cell adhesion markers and mesenchymal markers. Furthermore, when mutant huntingtin is expressed, tumour cells in culture adopt an altered morphology resembling a mesenchymal phenotype.

We then tested whether mutant huntingtin played a role in cell motility, which is a functional marker of EMT. We performed random cell migration assays with PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} primary tumour cells (Fig 4A). Cells expressing polyQ-huntingtin moved faster than the corresponding control cells. We also assessed the directed cell migration capacity of the two cell types using Boyden chamber assays, in which PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells transmigrated faster in response to serum than the PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} cells (Fig 4B). To compare the invasiveness of PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells, we used Boyden chambers containing a layer of ECM proteins on top of the membrane (Fig 4C) and found that PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells were more invasive than PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} cells. Finally, we assessed cell viability in suspension cultures. PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} suspension cultures contained more live cells than PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} suspension cultures as measured by annexin V and propidium iodide (PI) staining and flow cytometric analysis (Fig 4D). In contrast, the percentage of apoptotic and dead cells were lower in the cells that expressed polyQ-huntingtin. Taken together these results show that polyQ-huntingtin expression in cancer cells is associated with enhanced migratory and invasive behaviours, and an elevated resistance to anoikis.

We then assessed whether EMT acceleration in polyQ-huntingtin expressing cells could influence metastasis by analysing lung metastasis in MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} mice (Fig 4E). In the HD context,

metastasis was increased as compared to the wild-type situation. To exclude the possible effect of differential primary tumour growth on the lung metastasis analysis, we also grafted primary solid-tumour isolates from MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} mice into immunodeficient mice (Fig 4F). We found expression of polyQ-huntingtin in the engrafted tumour to increase the incidence of lung metastases as revealed by immunostaining of lung sections with an antibody directed against PyVT. Lung metastases were also more prevalent in immunodeficient mice engrafted with MMTV-ErbB2/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours as compared to MMTV-ErbB2/*Hdh*^{Q7/Q7} tumours (Supporting Information Fig S2D). Thus, expression of polyQ-huntingtin in tumour cells leads to EMT and increased tumour metastasis.

PolyQ-huntingtin leads to membrane accumulation of epidermal growth factor receptor ErbB2/HER2

How does mutant huntingtin enhance tumour aggressiveness? One possible molecular mechanism underlying the progression from normal breast epithelia to invasive cancer cells involves the accumulation of ErbB receptors (Roepstorff et al, 2008). We evaluated the levels of ErbB2 (rat neu or human HER2) in MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours by immunohistochemistry and found a marked increase of ErbB2 in polyQ-expressing tumours as compared to the control tumours (Fig 5A, left panels). The increase was specifically observed at the plasma membrane as revealed by linescan analysis (Fig 5A, right). Furthermore, it was confirmed by immunoblotting and corresponding quantification (Fig 5B). In heterozygous MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q111} mice, the accumulation of ErbB2 was intermediate (Supporting Information Fig S4B). We then analysed the levels of total and activated Akt – a well described downstream target of ErbB2 – in control and polyQ-huntingtin tumours. We observed a statistically significant activation of this pathway as detected by the increase in the ratio of the active *versus* the total level of Akt in MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} compared to MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} tumours (Fig 5B). Thus polyQ-huntingtin leads to ErbB2 accumulation and Akt activation.

Our microarray data revealed no obvious difference in ErbB2 mRNA levels in wild-type *versus* polyQ-huntingtin mammary tumours ($FC = -1.19$; p -value = 8.57×10^{-2}). Further analysis of the levels of ErbB2 transcripts by quantitative real-time RT-PCR in MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} breast tumours confirmed this observation (Fig 5C). Thus, it appears that ErbB2 accumulates at the membrane and the accumulation occurs at the posttranscriptional level.

PolyQ-huntingtin interferes with HER2/ErbB2 dynamin dependent endocytosis

Huntingtin is involved in intracellular trafficking and endocytosis, and polyQ-huntingtin impairs these functions (Caviston et al, 2007; Gauthier et al, 2004; Velier et al, 1998). Given the increase in ErbB2 at the plasma membrane in the presence of polyQ-huntingtin, we wondered whether polyQ-huntingtin would influence ErbB2 internalization. We induced ErbB2 internalization by inhibiting the specific regulator of ErbB2

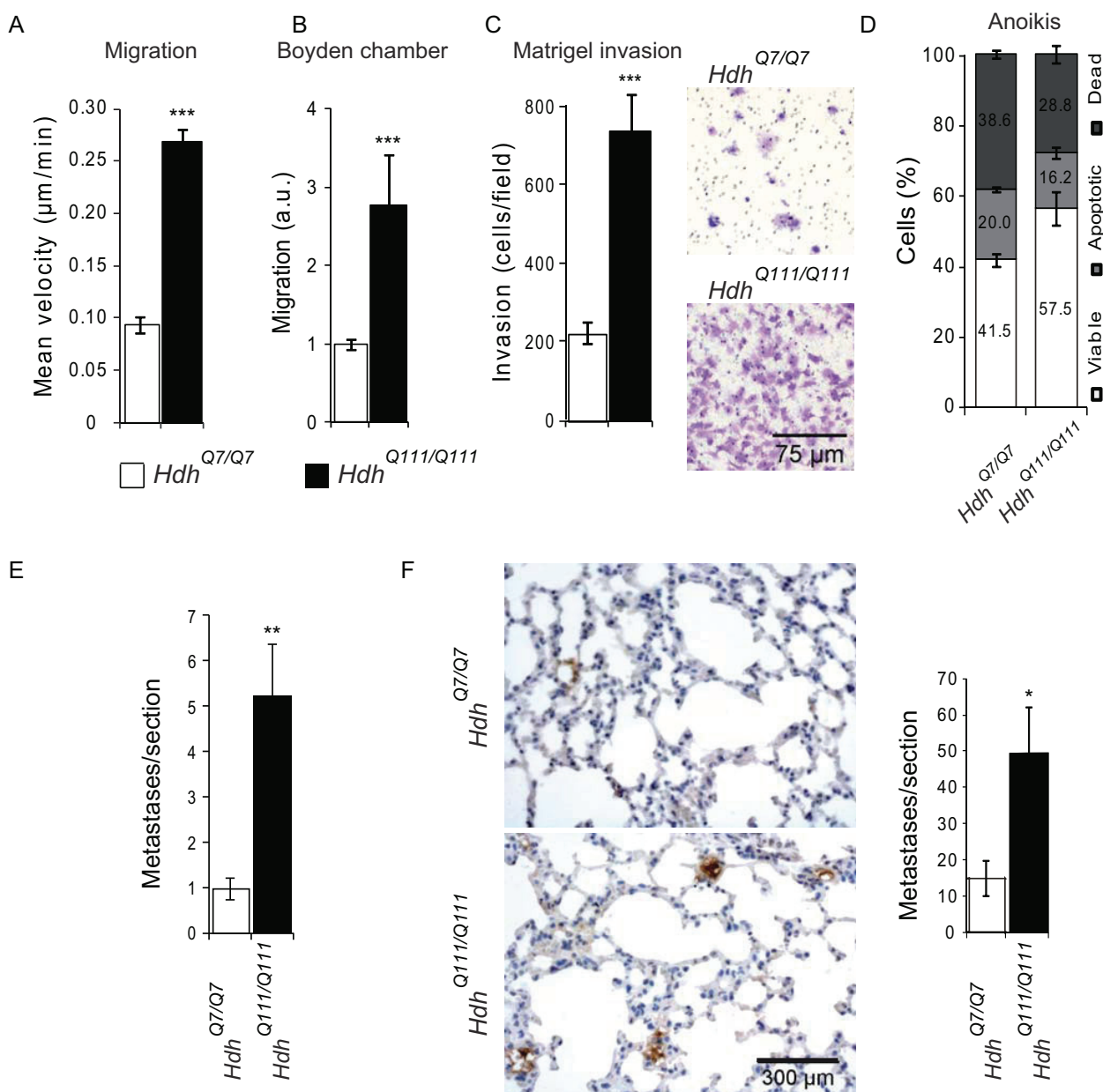


Figure 4. PolyQ-huntingtin promotes mammary cancer cell motility, resistance to cell death and distal metastases in the lung.

- A.** Random migration assays of PyVT/Hdh^{Q7/Q7} (Hdh^{Q7/Q7}) or PyVT/Hdh^{Q111/Q111} (Hdh^{Q111/Q111}) cells (3 independent primary cultures; at least 100 cells recorded). ****p*-value < 0.0001.
- B.** Boyden chambers assays for PyVT/Hdh^{Q7/Q7} and PyVT/Hdh^{Q111/Q111} cells (at least four independent primary cultures in duplicate per genotype). ****p*-value < 0.0001.
- C.** Boyden chambers with matrigel invasion assays for PyVT/Hdh^{Q7/Q7} and PyVT/Hdh^{Q111/Q111} cells (at least seven independent primary cultures in duplicate per genotype). Representative micrographs of invasion filter membranes after violet staining (*t* = 48 h) are shown. ****p*-value < 0.0001.
- D.** PyVT/Hdh^{Q7/Q7} and PyVT/Hdh^{Q111/Q111} cells were cultured in suspension, stained for annexin V and propidium iodide, and analysed by a flow cytometry analysis (four independent experiment, at least four independent primary cultures per genotype). Live, apoptotic and dead cell populations are quantified (live cells, *p*-value = 0.0099; apoptotic cells, *p*-value = 0.0835; dead cells, *p*-value = 0.0169).
- E.** Lungs from 12 weeks MMTV-PyVT/Hdh^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/Hdh^{Q111/Q111} mice are immunostained with anti-PyVT antibodies. The mean number of metastatic lesions per section is shown (*n* = 5 lungs per genotype; ***p*-value = 0.0060).
- F.** Lungs from mice grafted with MMTV-PyVT/Hdh^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/Hdh^{Q111/Q111} tumours immunostained with anti-PyVT antibodies. The mean number of metastatic lesions per section is shown (MMTV-PyVT/Hdh^{Q7/Q7}: *n* = 5 lungs; MMTV-PyVT/Hdh^{Q111/Q111}: *n* = 4 lungs; **p*-value = 0.0266). A second experiment gave similar results.

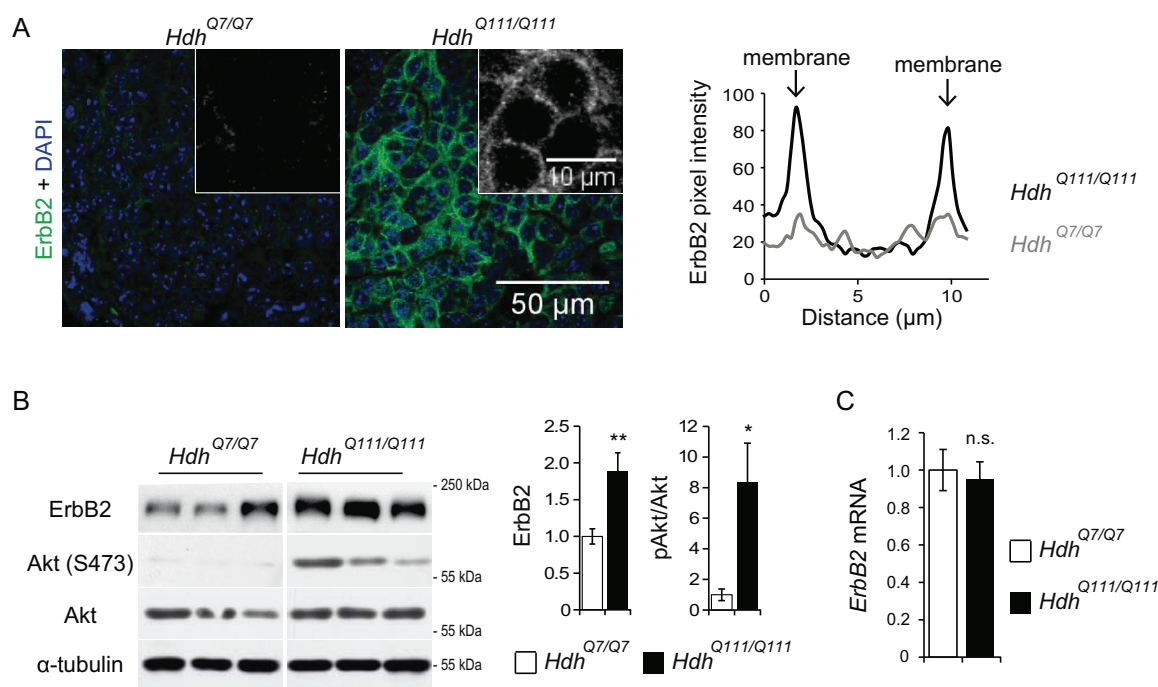


Figure 5. PolyQ-huntingtin promotes membrane ErbB2/HER2 accumulation and sustained signalling.

- A.** Immunostaining of sections from MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} (*Hdh*^{Q7/Q7}) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} (*Hdh*^{Q111/Q111}) tumours (originating from the 3rd mammary gland, 14 weeks) for the presence of ErbB2. Representative linescan analysis of the distribution of ErbB2 in wild-type and polyQ-huntingtin expressing cells within the tumour sections are shown.
- B.** Immunoblotting of total extracts from MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumours (originating from the 3rd mammary gland, 14 weeks) for ErbB2, phosphorylated Akt at serine 473 (Akt(S473)), total Akt and α-tubulin (at least *n* = 5 tumours per genotype, two independent immunoblotting; ErbB2/tubulin: ***p*-value = 0.0057; Akt(S473)/Akt: **p*-value = 0.0328).
- C.** mRNA levels of ErbB2 in MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} (*n* = 4) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} (*n* = 3) tumours as determined by quantitative PCR analysis (*p*-value = 0.7441; n.s., not significant).

stability Hsp90, using Geldanamycin (Citri et al, 2004). To address this question, we used as a model system the human SKBr3 breast cancer cell line, which as it was derived from a HER2-positive tumour, expresses high levels of HER2 (Fig 6A). In these cells, HER2 is mainly localized at the plasma membrane. We transfected SKBr3 cells with full-length wild-type (pARIS-mCherry-httQ23, Htt Q23) and polyQ-huntingtin (pARIS-mCherry-httQ100, Htt Q100; Pardo et al, 2010). Upon Geldanamycin treatment of SKBr3 cells, the staining of HER2 at the plasma membrane was markedly lower in cells expressing exogenous huntingtin of normal CAG length (Fig 6A; upper panel, star) and in non-transfected cells (arrowhead). In contrast, the decrease of HER2 staining at the membrane triggered by Geldanamycin treatment was much less efficient in the presence of exogenously expressed polyQ-huntingtin (compare transfected cell – bottom panel, star – with non polyQ-huntingtin transfected cell – arrowhead). We then specifically addressed the effect of mutant huntingtin on internalization by examining levels of HER2 at the cell surface by flow cytometry analysis (Fig 6B). SKBr3 cells expressing wild-type and mutant huntingtin were treated with Geldanamycin and immunostained with an antibody recognizing the extracellular part of HER2 prior to flow cytometry. As expected (Figs 5

and 6A), in the absence of Geldanamycin treatment, HER2 accumulated at the SKBr3 cell surface when mutant huntingtin was expressed as compared with control cells. Upon Geldanamycin treatment, the internalization of HER2 in cells expressing Htt Q23 was greater than in cells expressing Htt Q100 (Fig 6B). These results indicate that polyQ-huntingtin interferes with HER2 internalization.

Geldanamycin was reported to induce endocytosis-mediated degradation of ErbB2 through a dynamin-dependent mechanism (Pedersen et al, 2008). Indeed, we confirmed that expressing a GTPase-defective mutant K44A dynamin 2 (Dyn2 K44A) in SKBr3 cells treated with Geldanamycin partially blocked Geldanamycin-induced down-regulation of HER2 from the plasma membrane (Fig 6C). We thus asked whether the effect of mutant huntingtin on HER2 endocytosis could be dynamin-dependent. We co-expressed wild-type dynamin with wild-type or mutant huntingtin in SKBr3 cells and analysed HER2 at the cell surface by flow cytometry (Fig 6D). Dynamin led to the decrease of HER2 at the cell surface and this effect was partially blocked in cells expressing mutant huntingtin, suggesting that the mutant huntingtin blockage of HER2 internalization is dynamin-dependent.

What is the underlying mechanism by which huntingtin interferes with dynamin? Wild-type huntingtin was shown to interact with dynamin by yeast two hybrid (Kaltenbach et al, 2007). We investigated whether huntingtin could interact with dynamin in primary tumours cells and the possible consequence of the abnormal polyQ expansion in mutant huntingtin. We carried out immunoprecipitation experiments with an anti-huntingtin antibody (Fig 6E). Dynamin interacted with endogenous huntingtin and the interaction was greatly

enhanced when huntingtin contained an abnormally expanded polyQ stretch. Finally, we analysed the subcellular localization of these proteins by confocal microscopy. In SKBr3 cells expressing wild-type huntingtin, dynamin had a characteristic localization near the plasma membrane (Fig 6F). In the mutant situation, this localization where dynamin is known to act in endocytosis, was lost with dynamin being dispersed throughout the cytoplasm. We conclude that the stronger interaction of mutant huntingtin and dynamin leads to a

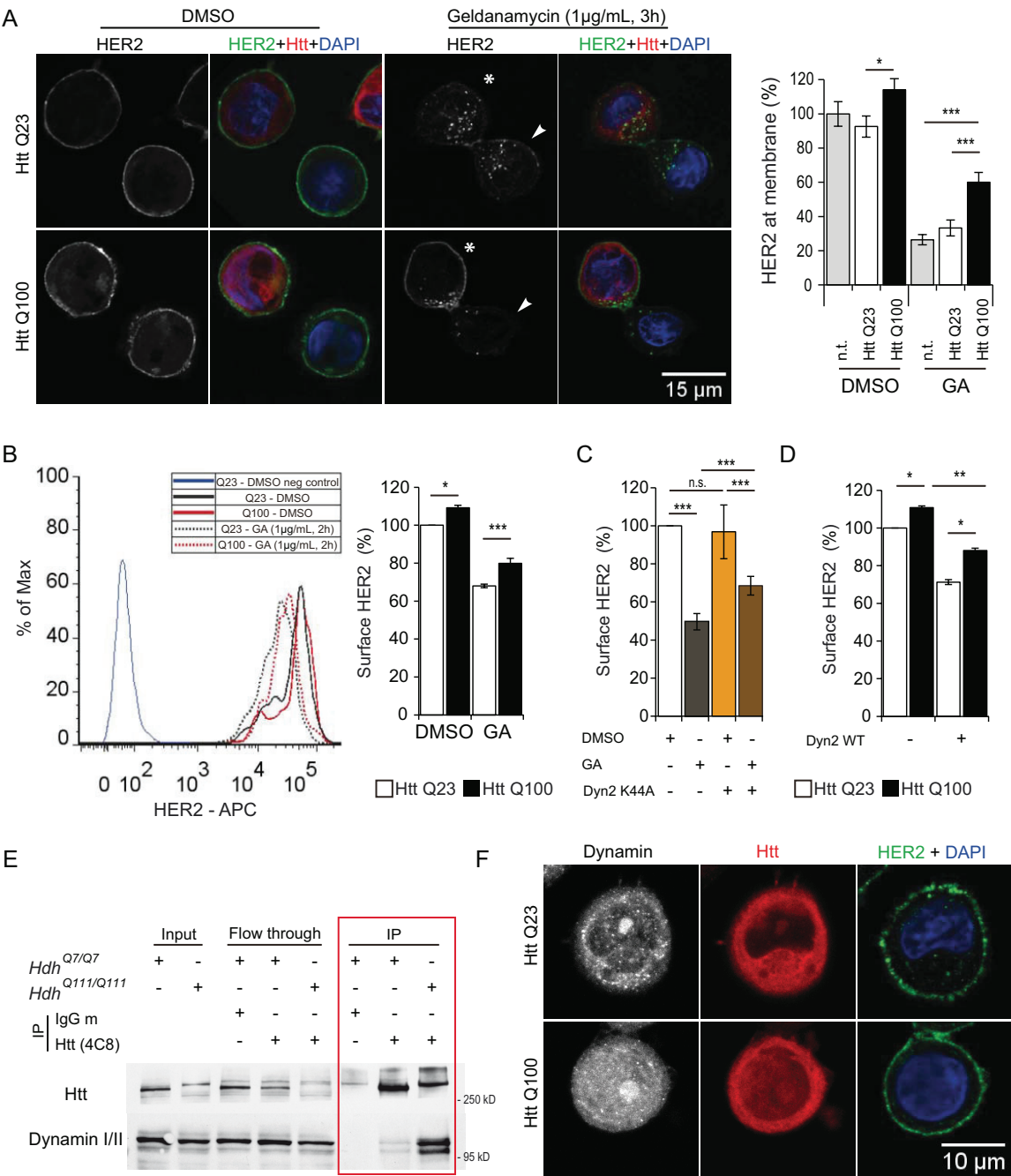


Figure 6.

redistribution of dynamin and a subsequent decreased endocytosis of HER2/ErbB2.

Trastuzumab inhibits polyQ-huntingtin induced HER2 accumulation and downstream effects

We then aimed to unequivocally address whether HER2 accumulation would explain the more aggressive phenotypes of HD tumours cells as compared to a control situation. For this purpose, we treated PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells with 20 µg/ml Trastuzumab, a monoclonal antibody targeting HER2/ErbB2. PolyQ-huntingtin led to ErbB2 accumulation in PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} primary tumour cells that was inhibited when cells were treated with Trastuzumab (Fig 7A; PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} normalized to 100% and PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111}/Trastuzumab: 41% ± 14%, four independent immunoblotting experiments of at least three samples, PLSD Fisher test $p < 0.05$). In particular, immunostainings specifically revealed a decrease of cell surface ErbB2 in PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} primary tumour cells upon Trastuzumab treatment (Fig 7B). Furthermore, Trastuzumab treatment was accompanied by an inhibition of ErbB2 triggered signalling in polyQ-huntingtin-expressing tumour cells. Indeed, the overactivation of Akt observed in PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells was decreased upon Trastuzumab treatment (Fig 7A; PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} normalized to 100% and PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111}/Trastuzumab: 79% ± 6%, four independent immunoblotting experiments of at least three samples, PLSD Fisher test $p < 0.05$).

We addressed the effect of Trastuzumab in functional assays. Trastuzumab had no effect on the migration of wild-type cells while it decreased the mean velocity of motile PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells (Fig 7C). Similarly, Trastuzumab decreased the directed cell migration capacity and invasiveness of PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells (Boyden chamber assays, Fig 7D; matrigel invasion, Fig 7E). In these assays, Trastuzumab had no effect on PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} cells behaviour. These data show that the Trastuzumab-induced reduction of ErbB2 levels in PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells counteracts the effect of polyQ-huntingtin on migration and invasiveness.

Finally, we tested the impact of Trastuzumab treatment on cell growth. Cells were treated for 24, 48 and 72 h with 20 µg/ml Trastuzumab. Trastuzumab did not affect cell number in PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} cells (Fig 7F). In sharp contrast, the same treatment resulted in a 49% decrease in PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cell number after 24–48 h and a 70% decrease after 72 h. Thus, PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumour cells appear to be hypersensitive to Trastuzumab as compared to PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} cells.

DISCUSSION

PolyQ-huntingtin is known to induce the activation of the apoptotic machinery in cellular and mouse models and to cause neuronal death (Zuccato et al, 2010). Increased apoptosis is also detected in human HD brains. In contrast, wild-type huntingtin protects against cell death induced by different stressors including polyQ-huntingtin itself, and has anti-apoptotic properties. We suggest here that the reported huntingtin functions depend on the cell type and the cell context being studied as we found that mutant huntingtin conferred resistance to anoikis to cancer cells while it renders them more sensitive to Trastuzumab treatment. Furthermore, expression of polyQ-huntingtin in mammary tumour cells changed their cell fate, as these cells were more prone to adopt a mesenchymal phenotype. Previous studies showed that polyQ-huntingtin interferes with neurogenesis. For instance, Simpson et al observed less hippocampal differentiation in a full-length polyQ-huntingtin mouse model of HD (Simpson et al, 2011). More generally, huntingtin is a positive transcriptional regulator of genes involved in neuronal maintenance, a function that is lost when huntingtin is mutated (Zuccato et al, 2003). Thus, huntingtin stands as a key regulator of the balance between cell differentiation, survival and death in normal, neoplastic and neurodegenerative conditions.

Here, we found a hyper-activation of the Akt pathway triggered by ErbB2/HER2. The Akt protein kinase is at the crossroads of essential cellular processes such as cell growth and survival, proliferation and migration (Brunet et al, 2001;

Figure 6. PolyQ-huntingtin inhibits ErbB2/HER2 endocytosis through a dynamin dependent mechanism.

- A,B.** Human SKBr3 cells are transfected with plasmids encoding full-length wild-type (pARIS-mCherry-httQ23, Htt Q23) and polyQ-huntingtin (pARIS-mCherry-httQ100, Htt Q100) and treated with Geldanamycin (GA) as indicated. n.t.: not transfected. **(A)** Cells are stained for HER2 and huntingtin (Htt). HER2 intensity at the membrane is quantified before and after treatment (at least $n = 24$ cells analysed per condition, three independent experiments). Htt Q23 DMSO *vs.* Htt Q100 DMSO: * p -value = 0.0204; n.t. GA *vs.* Htt Q100 GA: *** p -value < 0.0001; Htt Q23 GA *versus* Htt Q100 GA: *** p -value = 0.0006. **(B)** Cells are fixed, immunostained with the antibody recognizing the extracellular part of HER2 and analysed by flow cytometry. A representative flow cytometry profile is shown (left). The graphs in B, C and D represent mean HER2-APC fluorescence level (surface HER2; three independent experiments, 10,000 cells analysed per condition and experiment). Htt Q23 DMSO *versus* Htt Q100 DMSO: * p -value = 0.0141; Htt Q23 GA *versus* Htt Q100 GA: *** p -value = 0.0009.
- C.** SKBr3 cells are transfected with a construct expressing a GTPase-defective mutant K44A dynamin (Dyn2 K44A), treated with Geldanamycin as indicated and analysed by flow cytometry. (Three independent experiments, 10,000 cells analysed per condition and experiment). DMSO *versus* GA, *** p -value < 0.0001; DMSO *versus* Dyn2 K44A DMSO, p -value > 0.9999; GA *versus* Dyn2 K44A GA, *** p -value < 0.0001; Dyn2 K44A DMSO *versus* Dyn2 K44A GA, *** p -value = 0.0002. n.s., not significant.
- D.** SKBr3 cells are transfected with pARIS-mCherry-httQ23, pARIS-mCherry-httQ100 and a construct encoding wild-type dynamin (Dyn2 WT) and analysed by flow cytometry (three independent experiments, 10,000 cells analysed per condition and experiment). Htt Q23 *versus* Htt Q100, * p -value = 0.0491; Htt Q100 *versus* Htt Q100 + Dyn2 WT, ** p -value = 0.0016; Htt Q23 + Dyn2 WT *versus* Htt Q100 + Dyn2 WT, * p -value = 0.0136.
- E.** Huntingtin and dynamin interact in a polyQ-dependent manner. Huntingtin immunoprecipitation experiments were performed on cellular extracts from MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} (*Hdh*^{Q7/Q7}) and MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} (*Hdh*^{Q111/Q111}) tumours. Immunoprecipitation with mouse IgG (IgG m) is used as a control.
- F.** SKBr3 cells are transfected with plasmids encoding full-length wild-type (pARIS-mCherry-httQ23) and polyQ-huntingtin (pARIS-mCherry-httQ100) and stained for huntingtin (Htt) and dynamin.

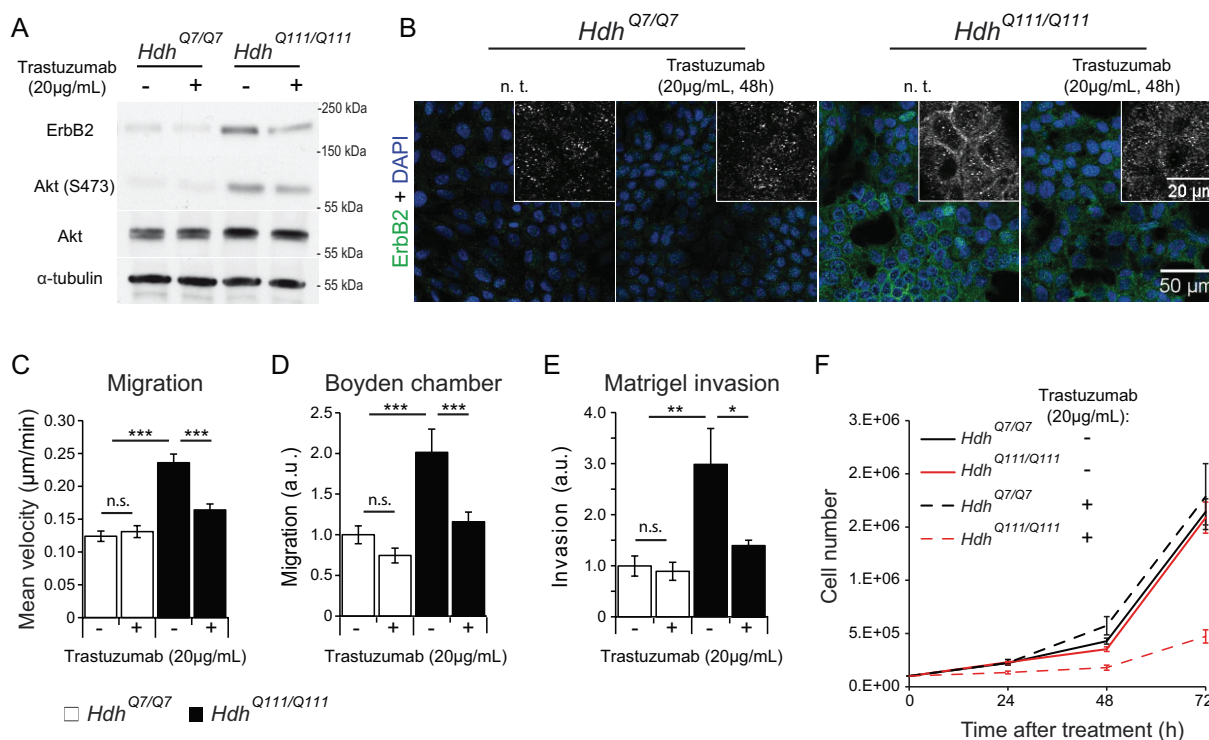


Figure 7. Trastuzumab inhibits polyQ-huntingtin induced HER2 accumulation and downstream effects on cell motility.

- A.** Immunoblotting of total extracts of PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} (*Hdh*^{Q7/Q7}) and PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} (*Hdh*^{Q111/Q111}) cells treated with Trastuzumab for ErbB2, phosphorylated Akt at serine 473 (Akt(S473)), total Akt and α-tubulin.
- B.** PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells treated with Trastuzumab are immunostained for endogenous ErbB2. n.t.: not treated.
- C–E.** Random migration (**C**), Boyden chambers (**D**) and Boyden matrigel invasion (**E**) assays for PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} or PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells treated with Trastuzumab. Random migration (three independent primary cultures, 118 cells recorded per condition; *Hdh*^{Q7/Q7} vs. *Hdh*^{Q7/Q7} Trastuzumab, *p*-value = 0.6326; *Hdh*^{Q7/Q7} vs. *Hdh*^{Q111/Q111}, ****p*-value < 0.0001; *Hdh*^{Q111/Q111} vs. *Hdh*^{Q111/Q111} Trastuzumab, ****p*-value < 0.0001). Boyden chambers (three independent primary culture in duplicate per genotype; *Hdh*^{Q7/Q7} vs. *Hdh*^{Q7/Q7} Trastuzumab, *p*-value = 0.2682; *Hdh*^{Q7/Q7} vs. *Hdh*^{Q111/Q111}, ****p*-value = 0.0001; *Hdh*^{Q111/Q111} vs. *Hdh*^{Q111/Q111} Trastuzumab, ****p*-value = 0.0007) and Boyden matrigel invasion (three independent primary cultures in duplicate per genotype; *Hdh*^{Q7/Q7} vs. *Hdh*^{Q7/Q7} Trastuzumab, *p*-value = 0.7599; *Hdh*^{Q7/Q7} vs. *Hdh*^{Q111/Q111}, ***p*-value = 0.0012; *Hdh*^{Q111/Q111} vs. *Hdh*^{Q111/Q111} Trastuzumab, **p*-value = 0.0101). n.s.: not significant.
- F.** Cell number of PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} and PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} cells treated with Trastuzumab for 24, 48 and 72 h (at least *n* = 3 primary culture per genotype in three independent experiments; at 72 h: *Hdh*^{Q7/Q7} vs. *Hdh*^{Q111/Q111}, *p*-value = 0.8391; *Hdh*^{Q7/Q7} Trastuzumab vs. *Hdh*^{Q111/Q111}, *p*-value = 0.4605; *Hdh*^{Q7/Q7} vs. *Hdh*^{Q7/Q7} Trastuzumab, *p*-value = 0.5909; *Hdh*^{Q111/Q111} vs. *Hdh*^{Q111/Q111} Trastuzumab, *p*-value = 0.0002).

Dillon & Muller, 2010). Akt is activated by IGF-1/phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signalling, and deregulation of this signalling contributes to cancer (Castaneda et al, 2010; Dillon & Muller, 2010). In particular, hyper-activation of this pathway is observed in breast cancer and consequently affects cell proliferation, migration, invasion and metastasis. In HD, IGF-1 signalling, Akt activity and subsequent phosphorylation of huntingtin at serine 421 are deregulated as HD progresses (Colin et al, 2005; Gines et al, 2003; Mochel et al, 2007; Pouladi et al, 2010; Saleh et al, 2009; Warby et al, 2005). Mutant huntingtin is a direct target of Akt. Upon IGF-1 activation, polyQ-huntingtin is phosphorylated at serine 421 by Akt (Humbert et al, 2002) and this phosphorylation event restores the capacity of polyQ-huntingtin to stimulate vesicular transport along microtubules, as does the wild-type protein (Zala et al, 2008). Thus, Akt-mediated phosphorylation of mutant huntingtin completely inhibits its toxicity in cellular and mouse models of HD

(Humbert et al, 2002; Pardo et al, 2006). Future experiments should test whether polyQ-huntingtin could also be one of the downstream targets of Akt in cancer that mediates its effect on tumour formation, cell motility and invasiveness.

The ErbB2/HER2 transmembrane tyrosine kinase is over-expressed in a number of human cancers (Roepstorff et al, 2008). ErbB2/HER2 has no known ligands but is the preferred dimerization partner for the other family members. Two models have been proposed for ErbB2/HER2 endocytosis [reviewed in (Roepstorff et al, 2008; Sorkin & Goh, 2008)]. ErbB2/HER2 dimers were shown to be endocytosed and mostly recycled back to the membrane for reactivation. Alternatively, ErbB2/HER2 dimers were reported to be retained to the cell surface as ErbB2/HER2 is endocytosis impaired. The Hsp90 chaperone machinery is a regulator of ErbB2/HER2 stability and inhibition of this regulation by Geldanamycin allows investigation into the status of ErbB2/HER2 at the membrane and its internalization

(Citri et al, 2004). Austin and colleagues reported that Geldanamycin enhances specifically the degradative sorting in endosomes with no effect on the initial endocytosis from the plasma membrane (Austin et al, 2004). In contrast, another study showed that Geldanamycin-induced downregulation of ErbB2/HER2 is dynamin- and clathrin-dependent, and independent of proteasomal activity (Pedersen et al, 2008). In our experimental conditions, the HER2 accumulation in HD conditions was dynamin-dependent in non-stimulated and Geldanamycin-treated SKBr3 cells. Huntingtin is distributed primarily in the cytoplasm but is also found in membrane fractions; it also localizes to endosomes and plasma membranes and interacts with proteins involved in membrane trafficking (DiFiglia et al, 1995; Kegel et al, 2005; Velier et al, 1998). We now provide a direct link between huntingtin and endocytosis by confirming that endogenously expressed huntingtin binds directly to dynamin (Kaltenbach et al, 2007). In HD, the binding is enhanced thereby displacing dynamin. The effect of mutant huntingtin could thus occur at the level of endocytosis leading to HER2 accumulation at the plasma membrane. As HER2 is constitutively available for dimerization with all other family members, this accumulation is sufficient to prolong downstream signalling and promote migration. Indeed, polyQ-huntingtin-induced cell migration is inhibited by Trastuzumab. Furthermore, confirming the central role of HER2 in polyQ-mediated effects, PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} tumour cells are hypersensitive to Trastuzumab as compared to PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} cells.

The ErbB receptor tyrosine kinases induce several signalling pathways that play central roles during development, in adults, and during disease processes (Eccles, 2011; Yarden & Sliwkowski, 2001). The receptors form homodimers and heterodimers and the way they assemble constitutes one layer of regulation of the network. Indeed, a specific dimer triggers a specific cellular response ranging from apoptosis to proliferation and cell adhesion to metastasis. Several reports have linked mutant huntingtin to abnormal epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) signalling. Mutant huntingtin inhibits the activation of Akt induced by epidermal growth factor stimulation in rat pheochromocytoma cells (Song et al, 2002). While huntingtin and EGFR are found in the same complex (Liu et al, 1997), the mechanisms by which mutant huntingtin induced the defects observed remain to be shown. In *Drosophila*, the polyQ-huntingtin-induced accumulation of the single *Drosophila* glutamate transporter DEAT1 is regulated by EGFR (Lievens et al, 2005). In their model, the authors expressed short huntingtin fragments that form massive aggregation that could physically block EGFR signalling at several levels. Future experiments should thus further elucidate whether huntingtin interferes with the dynamin-dependent endocytosis of one or several ErbB receptors. This does not exclude the possibility that, as previously suggested (Liu et al, 1997), huntingtin could also directly bind to these receptors with an altered binding when huntingtin is mutated.

Our data were somewhat unexpected since two studies showed an overall decreased risk of cancer in patients with HD (Ji et al, 2012; Sorensen et al, 1999). At the molecular level, the authors speculated that their findings would be linked to the

apoptotic properties of polyQ-huntingtin. While the incidence of cancer is lower, we propose here that the progression could be enhanced in HD. We also found an inverse correlation between the length of the abnormal CAG expansion and the age of breast cancer onset, suggesting that the CAG length in huntingtin may be a prognostic factor. In the study from Ji and collaborators (Ji et al, 2012), the CAG repeat length was not available. Instead, the authors used age at diagnosis as a surrogate and did not find a relation with risk of cancer. Nevertheless, we describe here polyQ-induced abnormalities in HER2 endocytosis in breast cancer cells with consequences on their motility and metastatic behaviour. This may apply only to a subset of cancer types, and this could be the case for breast cancer initiated by HER2 accumulation. Together, our data should not only trigger epidemiological studies on breast cancer in the HD population but may also sensitize clinicians and HD families to specific follow-up that will positively affect the quality of life of HD patients.

Finally, there is an urgent need for an effective treatment for HD, that will either slow down or halt the progression of neuronal dysfunction and degeneration. The development of such therapies is based on a sound understanding of the aetiology and pathogenesis of this disease. Our study leads us to propose that understanding polyQ-huntingtin-induced changes in peripheral tissues could give valuable insight into several pathways involved in neurodegenerative and cancer conditions, including those regulating the ErbB receptor tyrosine kinases family.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and DNA constructs

The antibodies used in this study are as follows: huntingtin (PQ-1C2-as, 1C2, Euromedex; HU-4C8-As, 4C8, Euromedex and D7F7, Cell Signaling Technologies); cleaved caspase-3 (9661S, Cell Signaling Technologies); PCNA (PC10, Santa Cruz); Ki67 (NCL-ki67p, Leica); E-cadherin (610182, BD Transduction Laboratories); β -Catenin (ab6302, Abcam); α -SMA (A5228, Sigma); ZO-1 (610966, BD Transduction Laboratories); vimentin (V6630, Sigma); α -tubulin (T6199, Sigma); PyVT (sc-53481, Santa Cruz); HER2 (Ab2428, Abcam); phospho-Akt (4058, Cell Signaling Technologies); Akt (9272, Cell Signaling Technologies); cadherin 11 (ab52891, Abcam); MMP3 (ab53015, Abcam); BARD1 (sc-11438, Santa Cruz); cyclin D2 (ab3085, Abcam); HER2-APC (340554, BD biosciences); dynamin I (sc-12724 m, Santa Cruz); dynamin I/II (2342, Cell Signaling Technologies); IgG mouse (12-371, Upstate biotechnologies). Secondary antibodies were anti-mouse/rabbit/rat antibodies conjugated to Alexa 488, Alexa 555 and Cy5 (immunofluorescence) or to HRP (immunoblotting; Invitrogen).

pARIS-mCherry-httQ23 (Htt Q23) and pARIS-mCherry-httQ100 (Htt Q100) were described in (Pardo et al, 2010). Plasmids encoding wild-type dynamin 2 (Dyn2 WT-GFP) and a GTPase-defective mutant K44A dynamin 2 (Dyn2 K44A-GFP) are a gift of S. Miserey-Lenkei (Institut Curie).

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation experiments were performed on primary PyVT tumour cells. Briefly cells were lysed in IP lysis buffer (50 mM Tris–

HCl, pH 7.5; 137 mM NaCl; 1% Triton X-100; 10 mM MgCl₂; 10% glycerol; 1% protease inhibitor cocktail, Sigma). One milligram of total protein extract in a total volume of 500 µl was incubated with 6 µg of 4C8 or IgG mouse antibody for 2 h followed by 1 h of incubation with 30 µl of protein A/G beads mix. Beads are washed three times in lysis buffer and then eluted in 50 µl of 1× Laemmli buffer by heating at 95°C for 10 min.

Boyden chamber assays

Matrigel invasion assays were performed in matrigel Boyden chambers (354483, BD Biosciences). 3×10^4 serum-starved cells were loaded in media containing 0.1% serum in the insert while the well was filled with media containing 10% serum. After 18 h, chambers were fixed and stained in 0.5% crystal violet (in 20% methanol). Images were taken using a light microscope and cells were counted. For Boyden chambers assays (353097, BD Biosciences), 5×10^3 cells were loaded per insert, chambers were fixed 6 h after.

Carmine aluminium whole mount staining

For whole mount analysis, the fourth pairs of mammary gland fat pads were dissected from female mice. Fat pads were spread on slides and fixed overnight in a methacarn solution containing 60% methanol, 30% chloroform and 10% acetic acid. Samples were then washed in 100% methanol before rehydrating and subsequent overnight staining in carmine alum solution (StemCell Technologies). Samples were dehydrated, de-stained in xylene and scanned using an Epson Perfection 3200 scanner.

Cell culture

Cells were cultured in humidified incubators at 37°C and 5% CO₂. SkBR3 cells (ATCC) were maintained in McCoy's 5A, GlutaMAX media (Gibco) supplemented with 10% foetal calf serum, 100 units/ml penicillin/streptomycin (Gibco). Cells were treated when indicated with Geldanamycin (Sigma) and Trastuzumab (Herceptin[®], Roche). Primary cells from MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q111/Q111} or MMTV-PyVT/*Hdh*^{Q7/Q7} tumours were cultured as described (Dangles-Marie et al, 2007) maintained at 8% CO₂ in DMEM supplemented with 10% foetal calf serum, 10 mmol/L HEPES buffer (Sigma), 1 mmol/L Sodium Pyruvate (Sigma), 100 units/ml penicillin/streptomycin (Gibco), 250 ng/ml Fungizone (Gibco). At least three different cell lines per genotype were generated from independent tumours. For the first three passages 200 µg/ml Gentamicin (Gibco) was added to the media. Transient transfections were performed using lipofectamine LTX (Invitrogen) according to supplier recommended procedures.

Cell motility

Random migration experiments were carried out in primary tumour cells. Cells in plastic six-well plates were imaged over at least 6 h using an inverted fluorescent 2D Leica DM IRB microscope with photometric CoolSNAP fx camera in a chamber with controlled temperature and CO₂ conditions and a moving stage. Dividing cells were excluded from the analysis. To access the effect of Trastuzumab on cell motility, cells where imaged 12 h after treatment with 20 µg/ml of Trastuzumab (Herceptin[®], Roche). The cell tracking plug-in of ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/track/track.html>) was used to calculate parameters of cell motility.

Flow cytometric analysis

For anoikis experiments, 5×10^5 cells were cultured in suspension for 16 h (37°C; 5% CO₂). Cells were stained with annexin V-FITC and/or propidium iodide (556547, BD Biosciences). Cytometric analysis was performed on FACS Calibur (Becton Dickinson). Fifteen thousand events were analysed using CellQuest (Becton Dickinson) and FlowJo software.

To study the levels of ErbB2 at the membrane SkBR3 cells were transfected with different constructs. Twenty-four hours after transfection cells were harvested and stained with HER2-APC antibody according to manufacturer instructions. Cytometric analysis was performed on FACS Aria III (BD Biosciences), 10,000 events per condition were analysed using FlowJo software. Mean-APC fluorescence levels were quantified in cells expressing either Htt Q23 or Q100 (mCherry positive, gated 10^3 to 10^5) and/or dynamin 2 constructs (FITC positive, gated 10^4 to 10^5). Histograms were created using FlowJo software.

Immunofluorescence

Cells were fixed in cold methanol and stained for the presence of E-cadherin (1:500), β-catenin (1:1000), HER2 (1:100) and dynamin (1:50) as indicated. For microscopic analysis of mammary tumours, tumours were dissected and fixed in AFA (75% ethanol, 5% glacial acetic acid and 20% of 4% paraformaldehyde in PBS 1×) for 2–3 h at RT. Tumour samples were cryoprotected in 30% sucrose (in PBS 1×), included in occipitocervicothoracic (OCT) and stored at –80°C until processing. Samples were processed for immunofluorescence imaging by cryostat sectioning (8 µm) and adhering to Thermo Scientific Superfrost glass slides. Slides were then stained for the presence of β-Catenin (1:200), E-Cadherin (1:2000), α-SMA (1:500) and ErbB2 (1:100). Briefly, slides were washed in PBST (PBS1×, 0.001% tween20); de-masked in citrate buffer 10 mM pH6.0 (90°C, 20 min), blocked in 5% goat serum; stained overnight at 4°C; washed in PBST and incubated with Alexa fluorescent secondary antibodies (RT, 30 min). Slides were washed in PBST and mounted in Fluoroshield with DAPI. Imaging was carried out using a Leica TCS-SP5 confocal microscope with 40× or 63× objective lens.

Mice

FVB/N-Tg(MMTV-PyVT)634Mul/J and FVB-Tg(MMTV-ErbB2)NK1Mul/J mice were obtained from The Jackson Laboratory. *Hdh*^{Q111/Q111} mouse line (CD1 background) have been described earlier (Wheeler et al, 1999). For tumour-free survival assays, mice were surveyed for tumour appearance by palpation. Spontaneous tumours dissected in small pieces (8 mm³) were grafted in the right flank of 6-week-old nude mice (Charles river laboratories: Crl:Nu(lco)-Foxn1 nu; Morton & Houghton, 2007). Tumour growth was followed and mice were sacrificed before the largest tumour reached 10% of the body weight. Tumoural progression was determined on mice sacrificed at 6, 8, 12 and 14 weeks of age. Abdominal mammary glands were dissected, stained with carmine aluminium and percentage of tumoural area was evaluated using ImageJ software. Metastasis was analysed on 12-week-old mice dissected lungs. Entire organs were included in paraffin and sectioned (7 µm sections with 100 µm interval; covering the entire lung). The number of metastasis was counted after PyVT staining. Experimental procedures were performed in accordance with

The paper explained

PROBLEM:

Huntington disease (HD) is a severe neurodegenerative disorder caused by an abnormal polyglutamine expansion (polyQ) in the huntingtin protein. Given the adult onset and the characteristic neuronal dysfunction and death of adult neurons in HD, most studies have focused on the toxic pathways activated by polyQ-huntingtin in post-mitotic neurons. However, over the last few years, emerging evidence point out that HD is also associated with peripheral manifestations. These symptoms may not be only secondary to the neuronal dysfunctions but linked to the presence of polyQ-huntingtin in the dysfunctioning tissues. Indeed, the protein is ubiquitous and plays critical roles in fundamental biological processes shared by all cells in the organism.

RESULTS:

Here, we investigated whether mutant huntingtin could influence the progression of breast cancer after we found it to be expressed in the mammary epithelium and tumours. We show

that mutant huntingtin accelerates tumourigenesis in two mouse breast cancer models, increases epithelial–mesenchymal transition of cancer cells and thus favours lung metastasis in mice. We then report that in HD, the dynamin dependent endocytosis of ErbB2/HER2 receptor tyrosine kinase is reduced leading to its accumulation and, to a subsequent increase in cell motility and proliferation.

IMPACT:

Our findings may have direct implications for the follow-up and care of HD patients and positively affect their quality of life. Furthermore, there is an urgent need for an effective treatment for HD. Our study demonstrates that understanding polyQ-huntingtin-induced dysfunctions in peripheral tissues gives unexpected but valuable insight into pathways involved in neurodegenerative and cancer conditions. Finally, we propose huntingtin to be a general regulator of the balance between cell differentiation, survival and death in normal, neoplastic and neurodegenerative conditions.

the recommendations of the European Community (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) for care.

RNA extraction, microarray and real time PCR

Total RNA was isolated from frozen mammary tumours using miRNeasy mini kit (Qiagen). One hundred nanograms of total RNA was amplified with Ambion[®] WT Expression Kit. cRNA products were monitored using the Nanodrop (Thermo, France) and the Agilent Bioanalyzer. Affymetrix Mouse Exon 1.0 ST arrays were hybridized according to Affymetrix (Santa Clara, USA) labelling and hybridization procedures. Microarrays were hybridized, washed and scanned using Affymetrix instruments. Total RNAs RIN values were between 8.1 and 9.3. Microarrays were hybridized with 4.7 µg of labelled DNA. Raw data are controlled with Expression console (Affymetrix).

RNA samples were retrotranscribed using the First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). cDNAs were diluted 1:10 and submitted to RT-PCR with 7900HT Fast real time PCR system (Applied biosystems) using power SYBR Green PCR Master mix (Applied biosystems) with the following *htt* (5'-CTCAGAAGTGCAGGCCTTACCT-3', 5'-GATTCCTCCGGTCTTTTGCTT-3' and 5'-CTCAGAAGTGCAGGCCTTACCT-3', 5'-GATTCCTCCGGTCTTTTGCTT-3'; Benn et al, 2008) and *ErbB2* (5'-GAAACCGGACCTCTCTACA-3', 5'-CGGAYCYCYGTCTCTTCG-3'; Landis et al, 2006) oligonucleotide pairs. *β-actin* (5'-AGGTGACAGCATTGCTCTG-3', 5'-GCTGCCTCAACACCTCAAC-3') and *hprt* (5'-GCTGGTGAAGGACCTCT-3', 5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3') genes were used as internal controls. Fold changes were calculated using the ddCT method.

Microarray data analysis

Dataset analysis and visualization were made using EASANA[®] (GenoSplice technology, www.genosplice.com), based on the GenoSplice's FAST DB[®] annotations. Exon Array data were normal-

ized using quantile normalization. Background correction was made by using the antigenomic probes. Only probes targeting exons annotated from FAST DB[®] transcripts were selected. Among these selected probes, bad-quality probes (e.g. probes labelled by Affymetrix as 'cross-hybridizing') and probes with too low intensity signal compared to antigenomic background probes with the same GC content were removed from the analysis. The *p*-values were not corrected for multiple comparisons. Probes with a DABG *p*-value ≤0.05 in at least half of the arrays were considered for statistical analysis. Only genes expressed in at least one compared condition were analysed. To be considered as expressed, the DABG *p*-value had to be ≤0.05 for at least half of the gene probes. Unpaired Student *t*-test was performed to compare gene intensities in the different biological replicates. Genes were considered significantly regulated when fold-change ≥1.5 and *p*-value ≤0.05. GEO accession number: GSE28685.

Hierarchical clustering

The distance from the gene signal in a given sample to the corresponding average in the eight samples was calculated for each regulated gene. Corresponding values were displayed and clustered with MeV4.6.2 from The Institute of Genome Research using Pearson correlation and average linkage clustering.

Statistical analyses

Statview 4.5 software (SAS Institute, Cary, NC) was used for statistical analyses. Data are expressed as means ± SE. Groups were compared by ANOVA followed by unpaired *t* tests or by Fisher's PLSD *post hoc*s analyses for multiple comparisons. For Fig 1A, a Kaplan–Meier Analysis was performed. Complete statistical analyses are available in the Supporting Information.

For more detailed Materials and Methods see the Supporting Information.

Author contributions

CMS performed most of the experiments; JRMG provided assistance in cellular motility assays and MST in anoikis and cellular motility assays; DG carried out the microarrays experiments; PdlG and STdM processed the microarrays and human data, respectively; AVS and AD provided human data and intellectual input regarding breast cancer (AVS) and HD (AD) pathologies; CMS and SH designed the experiments; SH wrote the manuscript. All the authors contributed to the preparation of the manuscript.

Acknowledgements

We greatly acknowledge: F. Saudou, M.A. Glukhova and C.T. Quang for reagents and/or discussions; L. Thibault for help with experiments; F.P. Cordelières (Institut Curie imaging facility), staff of the Institut Curie animal facility, S. Dodier (Institut Curie histology facility), C. Lasgi (Institut Curie Flow cytometry facility), N. Gruel, C. Hego, C. Jauffret, A. Nicolas and C. Reyes for advice and technical help; members of the Humbert and Saudou's laboratories for helpful comments. This work was supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche – Maladies Rares (ANR-09-BLAN-0080, S.H.), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC subvention libre n°3188, S.H.), CNRS, INSERM and Institut Curie. C.M.S. was supported by a Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) doctoral fellowship (SFRH/BD/60728/2009); J.R.M. by an ARC post-doctoral fellowship; M.S.T by a MENRT doctoral fellowship; A.D. and A.V.S. are supported by INTERFACE Inserm grant; S.H. is an INSERM/AP-HP investigator.

Supporting Information is available at EMBO Molecular Medicine online.

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Austin CD, De Maziere AM, Pisacane PI, van Dijk SM, Eigenbrot C, Sliwkowski MX, Klumperman J, Scheller RH (2004) Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol Biol Cell* 15: 5268-5282
- Benn CL, Fox H, Bates GP (2008) Optimisation of region-specific reference gene selection and relative gene expression analysis methods for pre-clinical trials of Huntington's disease. *Mol Neurodegener* 3: 1-17
- Borrell-Pages M, Zala D, Humbert S, Saudou F (2006) Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci* 63: 2642-2660
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11: 297-305
- Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM (2010) The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29: 751-759
- Caviston JP, Ross JL, Antony SM, Tokito M, Holzbaur EL (2007) Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10045-10050
- Cheng WY, Kandel JJ, Yamashiro DJ, Canoll P, Anastassiou D (2012) A multi-cancer mesenchymal transition gene expression signature is associated with prolonged time to recurrence in glioblastoma. *PLoS One* 7: e34705
- Citri A, Kochupurakkal BS, Yarden Y (2004) The achilles heel of ErbB-2/HER2: regulation by the Hsp90 chaperone machine and potential for pharmacological intervention. *Cell Cycle* 3: 51-60
- Colin E, Regulier E, Perrin V, Durr A, Brice A, Aebischer P, Deglon N, Humbert S, Saudou F (2005) Akt is altered in an animal model of Huntington's disease and in patients. *Eur J Neurosci* 21: 1478-1488
- Dangles-Marie V, et al (2007) Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: comparison of success rate and cell line features. *Cancer Res* 67: 398-407
- DiFiglia M, et al (1995) Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14: 1075-1081
- Dillon RL, Muller WJ (2010) Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res* 70: 4260-4264
- Duyao MP, et al (1995) Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269: 407-410
- Eccles SA (2011) The epidermal growth factor receptor/ErbB/HER family in normal and malignant breast biology. *Int J Dev Biol* 55: 685-696
- Gauthier LR, et al (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118: 127-138
- Gines S, Ivanova E, Seong IS, Saura CA, MacDonald ME (2003) Enhanced Akt signaling is an early pro-survival response that reflects N-methyl-D-aspartate receptor activation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *J Biol Chem* 278: 50514-50522
- Godin JD, et al (2010) Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67: 392-406
- Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ (1992) Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol* 12: 954-961
- Harjes P, Wanker EE (2003) The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* 28: 425-433
- Hoogeveen AT, Willemsen R, Meyer N, de Rooij KE, Roos RA, van Ommen GJ, Galjaard H (1993) Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum Mol Genet* 2: 2069-2073
- Humbert S, Bryson EA, Cordelières FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S, Greenberg ME, Saudou F (2002) The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* 2: 831-837
- Ji J, Sundquist K, Sundquist J (2012) Cancer incidence in patients with polyglutamine diseases: a population-based study in Sweden. *Lancet Oncol* 13: 642-648
- Kaltenbach LS, et al (2007) Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet* 3: e82
- Kegel KB, et al (2002) Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J Biol Chem* 277: 7466-7476
- Kegel KB, et al (2005) Huntingtin associates with acidic phospholipids at the plasma membrane. *J Biol Chem* 280: 36464-36473
- Kim H, Watkinson J, Varadan V, Anastassiou D (2010) Multi-cancer computational analysis reveals invasion-associated variant of desmoplastic reaction involving INHBA, THBS2 and COL11A1. *BMC Med Genomics* 3: 1-11
- Landis MD, Seachrist DD, Abdul-Karim FW, Keri RA (2006) Sustained trophism of the mammary gland is sufficient to accelerate and synchronize development of ErbB2/Neu-induced tumors. *Oncogene* 25: 3325-3334
- Li SH, Li XJ (2004) Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 20: 146-154
- Lievins JC, Rival T, Iche M, Chneiweiss H, Birman S (2005) Expanded polyglutamine peptides disrupt EGF receptor signaling and glutamate transporter expression in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 14: 713-724

- Liu YF, Deth RC, Devys D (1997) SH3 domain-dependent association of huntingtin with epidermal growth factor receptor signaling complexes. *J Biol Chem* 272: 8121-8124
- Lumsden AL, Henshall TL, Dayan S, Lardelli MT, Richards RI (2007) Huntingtin-deficient zebrafish exhibit defects in iron utilization and development. *Hum Mol Genet* 16: 1905-1920
- Menalled L, et al (2009) Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiol Dis* 35: 319-336
- Metzler M, Helgason CD, Dragatsis I, Zhang T, Gan L, Pineault N, Zeitlin SO, Humphries RK, Hayden MR (2000) Huntingtin is required for normal hematopoiesis. *Hum Mol Genet* 9: 387-394
- Mochel F, et al (2007) Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. *PLoS One* 2: e647
- Morton CL, Houghton PJ (2007) Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc* 2: 247-250
- Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R, Leder P (1988) Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* 54: 105-115
- Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81: 811-823
- Pardo R, Colin E, Regulier E, Aebischer P, Deglon N, Humbert S, Saudou F (2006) Inhibition of calcineurin by FK506 protects against polyglutamine-huntingtin toxicity through an increase of huntingtin phosphorylation at S421. *J Neurosci* 26: 1635-1645
- Pardo R, Molina-Calavita M, Poizat G, Keryer G, Humbert S, Saudou F (2010) pARIS-htt: an optimised expression platform to study huntingtin reveals functional domains required for vesicular trafficking. *Mol Brain* 3: 1-17
- Pedersen NM, Madhus IH, Haslekas C, Stang E (2008) Geldanamycin-induced down-regulation of ErbB2 from the plasma membrane is clathrin dependent but proteasomal activity independent. *Mol Cancer Res* 6: 491-500
- Pouladi MA, et al (2010) Full-length huntingtin levels modulate body weight by influencing insulin-like growth factor 1 expression. *Hum Mol Genet* 19: 1528-1538
- Roepstorff K, Grovdal L, Grandal M, Lerdrup M, van Deurs B (2008) Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol* 129: 563-578
- Saleh N, Moutereau S, Durr A, Krystkowiak P, Azulay JP, Tranchant C, Broussolle E, Morin F, Bachoud-Levi AC, Maison P (2009) Neuroendocrine disturbances in Huntington's disease. *PLoS One* 4: e4962
- Sassone J, Colciago C, Cislighi G, Silani V, Ciammola A (2009) Huntington's disease: the current state of research with peripheral tissues. *Exp Neurol* 219: 385-397
- Simpson JM, Gil-Mohapel J, Pouladi MA, Ghilan M, Xie Y, Hayden MR, Christie BR (2011) Altered adult hippocampal neurogenesis in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis* 41: 249-260
- Song C, Perides G, Liu YF (2002) Expression of full-length polyglutamine-expanded Huntingtin disrupts growth factor receptor signaling in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Biol Chem* 277: 6703-6707
- Sorensen SA, Fenger K, Olsen JH (1999) Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: an apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? *Cancer* 86: 1342-1346
- Sorkin A, Goh LK (2008) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* 314: 3093-3106
- Trottier Y, Devys D, Imbert G, Saudou F, An I, Lutz Y, Weber C, Agid Y, Hirsch EC, Mandel JL (1995) Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat Genet* 10: 104-110
- van der Burg JM, Bjorkqvist M, Brundin P (2009) Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol* 8: 765-774
- Velier J, Kim M, Schwarz C, Kim TW, Sapp E, Chase K, Aronin N, DiFiglia M (1998) Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Exp Neurol* 152: 34-40
- Warby SC, Chan EY, Metzler M, Gan L, Singaraja RR, Crocker SF, Robertson HA, Hayden MR (2005) Huntingtin phosphorylation on serine 421 is significantly reduced in the striatum and by polyglutamine expansion in vivo. *Hum Mol Genet* 14: 1569-1577
- Wheeler VC, et al (1999) Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Hum Mol Genet* 8: 115-122
- White JK, Auerbach W, Duyao MP, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME (1997) Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat Genet* 17: 404-410
- Woda JM, Calzonetti T, Hilditch-Maguire P, Duyao MP, Conlon RA, MacDonald ME (2005) Inactivation of the Huntington's disease gene (Hdh) impairs anterior streak formation and early patterning of the mouse embryo. *BMC Dev Biol* 5: 1-17
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-137
- Zala D, Colin E, Rangone H, Liot G, Humbert S, Saudou F (2008) Phosphorylation of mutant huntingtin at S421 restores anterograde and retrograde transport in neurons. *Hum Mol Genet* 17: 3837-3846
- Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A (1995) Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* 11: 155-163
- Zoghbi HY, Orr HT (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 23: 217-247
- Zuccato C, et al (2003) Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 35: 76-83
- Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E (2010) Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in Huntington's disease. *Physiol Rev* 90: 905-981

Article 4. La HTT sauvage dans la mammogenèse

“Huntingtin regulates mammary stem cell division and differentiation”

Salah Elias, Morgane S. Thion, Hua Yu, Cristovao Marques Sousa,
Charlène Lasgi, Xavier Morin, and Sandrine Humbert

Stem Cell Reports, 2014, Vol. 2:491-506

Un postdoctorant du laboratoire s'est intéressé aux rôles de la HTT sauvage dans le développement de la glande mammaire. J'ai contribué à celle-ci en réalisant avec Salah Elias la mise au point de tri par cytométrie de flux des différentes populations mammaires à partir des glandes mammaires murines ainsi que les expériences de clonogenité en culture cellulaire de différentes populations de cellules mammaires isolées. D'autre part, j'ai aidé à la mise au point des dissections des glandes mammaires embryonnaires.

Dans un premier temps, nous avons isolé à partir de glandes mammaires de souris vierges les différentes populations mammaires par cytométrie de flux en utilisant des marqueurs classiques : les cellules luminales (CL) caractérisées par le phénotype CD24^{fort}, CD49f^{faible} et les cellules basales (CB) par un phénotype CD24^{faible} CD49f^{fort}. La HTT est exprimée dans les deux compartiments mammaires, basal et luminal, mais son niveau d'expression est presque trois fois plus important dans les CLs en comparaison des CBs.

Afin d'étudier les fonctions de la HTT dans le développement mammaire, des souris présentant une délétion conditionnelle de la HTT spécifiquement dans la couche basale du lignage mammaire ont été générées en croisant des souris dont le gène codant la HTT est floxé (*Hdh^{flox/flox}*) à des souris exprimant la recombinaise cre sous le contrôle du promoteur de la kératine basale K5. L'expression transcriptionnelle de la HTT est diminuée de 79% dans les CBs des souris mutantes par comparaison avec celle des souris contrôles mais aussi dans une moindre mesure (39%) dans les CLs. Les glandes des souris mutantes sont hypoplasiques et les capacités clonogéniques des CBs mutantes sont amoindries en comparaison des contrôles. En bon accord, l'expression transcriptionnelle de Ki67 est diminuée dans les CLs et les CBs des glandes mutantes. Au niveau moléculaire, les expressions transcriptionnelles des marqueurs basaux tels que *TRP63*, *SNAI1*, *SNAI2*, *VIM*, sont augmentées dans les CLs et diminuées dans les CBs tandis que les marqueurs luminaux tels que *KRT18*, *ELF5*, *KIT*, *ESR1*, *PGR*, *PRLR*, *GATA3*, sont diminués dans les CLs et augmentés dans les CBs. De plus, les canaux des

glandes mammaires mutantes présentent des cellules exprimant à la fois la kératine basale K14 et la kératine luminale K8. La voie NOTCH, impliquée dans la détermination du devenir cellulaire, est moins activée dans les CBs mais elle est suractivée dans les CLs. L'augmentation de la voie NOTCH dans les CLs ainsi que la diminution d'expression des RH dans les glandes mutantes suggèrent que l'absence de HTT pourrait altérer la différenciation luminale des cellules mammaires. Nous avons donc isolé les CLs matures (SCA1+CD49B-) et les CLs progénitrices (SCA-CD49B+) et observé une diminution du nombre de CLs matures chez les glandes mutantes par comparaison avec glandes contrôles. Ainsi, la diminution de l'expression de HTT altère l'acquisition des différents lignages mammaires, luminal et basal.

La mammogenèse des souris gestantes et lactantes durant laquelle la HTT est fortement exprimée a été analysée. A 18.5 jour de gestation et à 1 jour de lactation chez les souris mutantes, on observe une diminution des structures alvéolaires. Lorsque ces structures alvéolaires sont présentes, elles sont moins développées et durant la lactation, elles présentent des déficits de sécrétion. Bien que plus prolifératives, elles possèdent toujours des cellules apoptotiques à l'inverse des glandes contrôles où les lumens sont bien formés, suggérant un délai dans l'apoptose. A 1 jour de lactation, les cellules alvéolaires présentent moins d'activation de STAT5A (signal transducer and activator of transcription 5A), qui régule l'expression de gènes impliqués dans la différenciation alvéolaire et la lactation, mais aussi une moindre expression transcriptionnelle des protéines du lait WAP (*Wap*) et de la β -caséine (*Csn2*). A 18.5 jour de gestation, les CLs ne peuvent pas être distinguées des CBs. De plus, la polarisation des cellules épithéliales est altérée dans les glandes des souris mutantes : on observe une diffusion des marqueurs des jonctions intercellulaires, la E-cadhérine, PAR3, ZO1 et aPKC vers le cytoplasme. Ainsi, la perte de HTT altère l'alvéologenèse mammaire ; la différenciation morphologique et fonctionnelle ainsi que la polarisation épithéliale et la production de lait sont affectées.

Quels mécanismes cellulaires peuvent expliquer ces phénotypes ? La HTT est impliquée dans l'établissement du fuseau mitotique des progéniteurs neuronaux et l'orientation du fuseau mitotique peut-être cruciale pour la différenciation des progéniteurs en sous-types moléculaires différenciés. La HTT est localisée au niveau des pôles du fuseau mitotique durant la métaphase et est présente au niveau du cortex cortical pendant la métaphase et l'anaphase. A 7.5 jour de gestation, l'angle de division du fuseau mitotique des CBs est altéré chez les mutants lors de la métaphase et de la télophase ; l'angle de division des BCs mutantes est oblique et verticale et non planaire/horizontale démontrant que l'absence de HTT altère l'orientation du fuseau mitotique des BCs en division.

De la même façon, lorsque l'expression de la HTT ou de la dynéine est diminuée par approche si-ARN dans la lignée MCF10A, une lignée cellulaire humaine, l'angle de division de fuseau mitotique

est altéré bien que la durée de la mitose soit similaire. Ce défaut est rétabli par l'expression d'une forme exogène de HTT pleine longueur (FLHTT) mais pas par une forme de HTT qui ne présente pas son domaine d'interaction avec la dynéine (HTT Δ DYN) et qui est incapable de se localiser au niveau des pôles de division du fuseau mitotique. Ces résultats suggèrent que la HTT régule l'orientation du fuseau mitotique par l'intermédiaire de son interaction avec la dynéine.

Durant l'interphase, la HTT est localisée au niveau du cytosol et présente un marquage ponctiforme. Pendant la mitose, de la prophase, à l'anaphase, la HTT est enrichie aux pôles du fuseau mitotique et durant la prométaphase et la métaphase, un marquage au-dessous du cortex cellulaire, semblable à celui de l'extrémité plus des microtubules est observé. Le complexe dynéine/dynactine, ainsi que la protéine P150^{Glued}, LGN et NuMA sont nécessaires à la formation du fuseau mitotique ; la HTT colocalise aux pôles du fuseau et forme un complexe macromoléculaire avec la dynéine, P150^{Glued}, NUMA et LGN. Lorsque l'expression de la HTT est diminuée, la localisation de ces protéines durant la métaphase est altérée. On observe une relocalisation de P150^{Glued}, de la dynéine, de NUMA et de LGN du cortex cellulaire aux pôles du fuseau mitotique. Comme précédemment, ces défauts peuvent être rétablis avec la HTTFL mais pas avec la HTT Δ DYN. En bon accord avec ces observations, dans les souris mutantes, la localisation corticale de NUMA et LGN durant l'anaphase des CBs est moindre par comparaison avec les glandes des souris contrôles. Ainsi, la HTT joue un rôle clé dans la localisation du complexe dynéine/dynactine/NUMA/LGN au niveau du cortex cellulaire.

Dans la lignée MCF10, la HTT et la kinésine 1 colocalisent aux pôles du fuseau mitotique et au niveau des microtubules astraux durant la métaphase et font parties d'un complexe commun. Une diminution de l'expression de HTT altère la localisation de la kinésine 1 aux niveaux des pôles du fuseau et des microtubules astraux. Les localisations de P150^{Glued}, de la dynéine et de NUMA au niveau des microtubules astraux et de LGN au niveau du cortex cellulaire, sont altérées lorsque l'expression de la kinésine 1 est diminuée par approche si-RNA. Un traitement au nocodazole altère les localisations de HTT, de P150^{Glued}, de la dynéine, de NUMA et de LGN aux pôles du fuseau mitotique et de P150^{Glued}, la dynéine, NUMA et LGN au cortex cellulaire. En particulier, les croissants corticaux bipolaires de LGN classiquement observés au cours de la métaphase disparaissent et la distribution de LGN est diffuse le long du cortex cellulaire. Ces résultats démontrent que les microtubules sont indispensables à une localisation fonctionnelle de ces protéines durant la métaphase. Ainsi, la HTT régule, par l'intermédiaire de la kinésine 1, la dynamique intracellulaire du complexe dyneine/dynactin/NUMA/LGN le long des microtubules astraux.

En conclusion, cette étude suggère que la HTT joue un rôle majeur dans la mammogénèse (Figure 26). Au niveau cellulaire, la HTT régule l'orientation du fuseau mitotique : par l'intermédiaire de son interaction avec la dynéine, la HTT se localise aux niveaux de pôles de fuseau de division et

permet ainsi l'accumulation de NUMA et LGN au sein d'un complexe macromoléculaire. Elle est nécessaire à la localisation corticale de la dynéine, de la dynactine, de NUMA et de LGN en régulant leur transport kinésine 1-dépendant le long des microtubules des pôles du fuseau mitotique jusqu'au cortex cellulaire. La HTT, en régulant l'orientation des cellules souches mammaires, pourrait ainsi affecter leurs capacités d'autorenouvellement et de différenciation et altérer la mammogénèse.

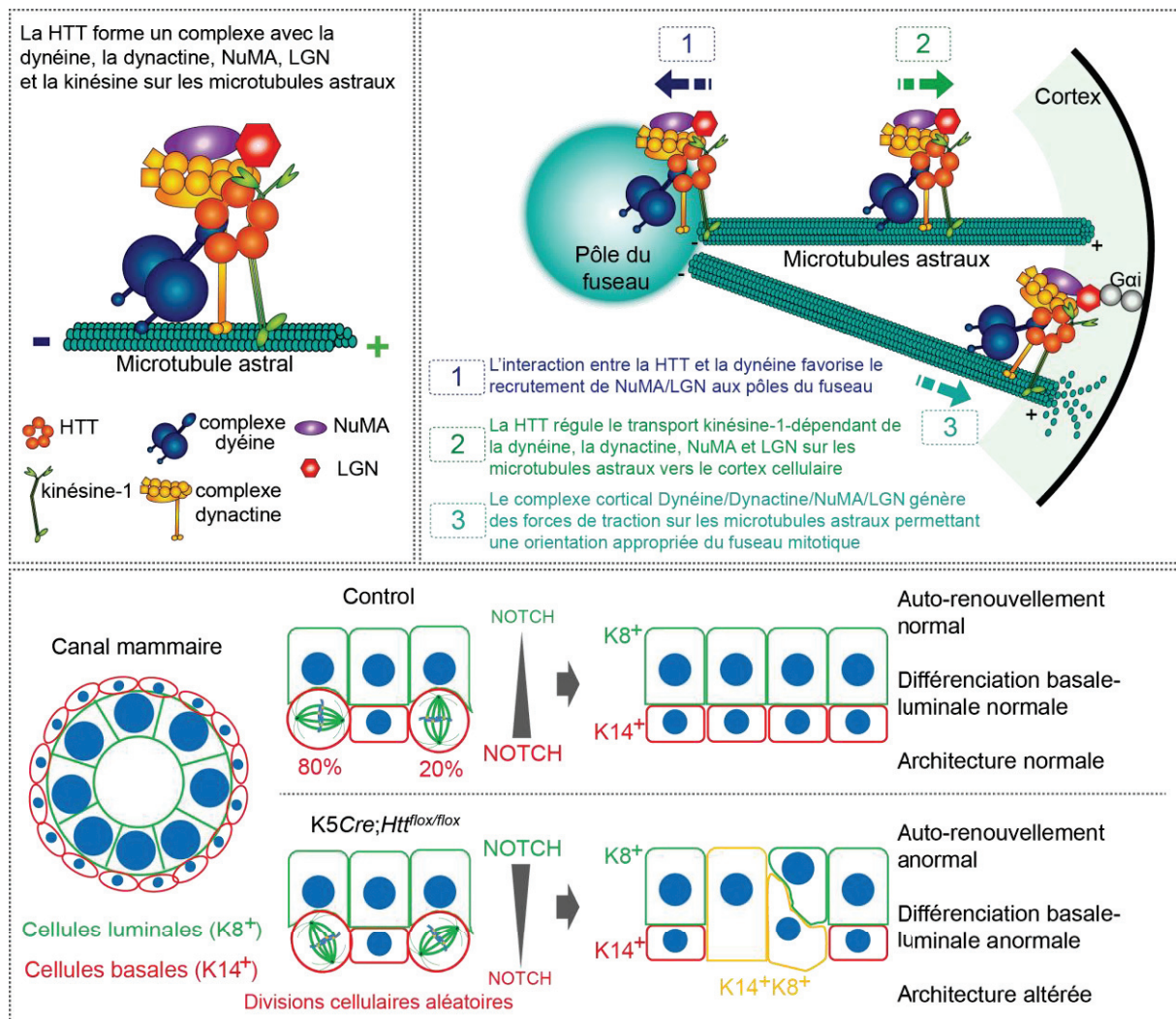


Figure 28 | Schéma récapitulatif de l'implication de la HTT dans la division et la différenciation des cellules souches mammaires.

Huntingtin Regulates Mammary Stem Cell Division and Differentiation

Salah Elias,^{1,2,3} Morgane S. Thion,^{1,2,3} Hua Yu,^{1,2,3} Cristovao Marques Sousa,^{1,2,3} Charlène Lasgi,^{1,2,3} Xavier Morin,^{4,5,6} and Sandrine Humbert^{1,2,3,*}

¹Institut Curie, Orsay 91405, France

²CNRS UMR 3306, Orsay 91405, France

³INSERM U1005, Orsay 91405, France

⁴Ecole Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS, IBENS, Paris 75005, France

⁵INSERM U1024, Paris 75005, France

⁶CNRS UMR 8197, Paris 75005, France

*Correspondence: sandrine.humbert@curie.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.02.011>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

SUMMARY

Little is known about the mechanisms of mitotic spindle orientation during mammary gland morphogenesis. Here, we report the presence of huntingtin, the protein mutated in Huntington's disease, in mouse mammary basal and luminal cells throughout mammary morphogenesis. Keratin 5-driven depletion of huntingtin results in a decreased pool and specification of basal and luminal progenitors, and altered mammary morphogenesis. Analysis of mitosis in huntingtin-depleted basal progenitors reveals mitotic spindle misorientation. In mammary cell culture, huntingtin regulates spindle orientation in a dynein-dependent manner. Huntingtin is targeted to spindle poles through its interaction with dynein and promotes the accumulation of NUMA and LGN. Huntingtin is also essential for the cortical localization of dynein, dynactin, NUMA, and LGN by regulating their kinesin 1-dependent trafficking along astral microtubules. We thus suggest that huntingtin is a component of the pathway regulating the orientation of mammary stem cell division, with potential implications for their self-renewal and differentiation properties.

INTRODUCTION

There are three distinct and differentially regulated stages in mammary gland development (embryonic, pubertal, and pregnancy/lactation), and the most substantial remodeling is postnatal (Gjorevski and Nelson, 2011). The mammary epithelium is organized into two cell layers: the luminal and basal myoepithelial layers. During pregnancy, the mammary gland completes its morphogenesis with the formation of alveolar buds where milk production is turned on at the end of pregnancy and during lactation (Silberstein, 2001). This developmental process is controlled by steroid hormones (Beleut et al., 2010). During lactation, luminal cells (LCs) produce and secrete milk, whereas basal myoepithelial cells (BCs) contract to release the milk from the nipple (Moumen et al., 2011).

Several lines of evidence indicate the existence of mammary stem cells (MaSCs) in mouse mammary tissue. These cells display the regenerative properties required for the substantial developmental changes in the adult mammary gland (Visvader and Lindeman, 2011). MaSCs have been isolated from adult mouse mammary tissue using the surface markers CD24 and $\beta 1$ or $\alpha 6$ -integrin chains (Shackleton et al., 2006). These populations are negative for steroid hormone receptors and consist of cells that express basal cell markers (Asselin-Labat et al., 2010). However, these populations appear to be composed of various subpopulations, ranging from multipotent stem cells to terminally differentiated luminal epithelial and myoepithelial cells

(Visvader and Lindeman, 2011). Furthermore, the LC compartment itself is heterogeneous because progenitors of varying states of luminal differentiation and with diverse proliferative capacities can be identified (Shehata et al., 2012).

The importance of asymmetric cell divisions for stem cells/progenitors has been established in several tissues (Morin and Bellaïche, 2011; Shitamukai and Matsuzaki, 2012). In the mouse mammary gland, the reproductive cycle may alter the MaSC population by regulating the balance between symmetric and asymmetric divisions (Asselin-Labat et al., 2010; Joshi et al., 2010). Experimental perturbation of this balance results in abnormal epithelial morphogenesis and favors tumor growth (Cicalese et al., 2009; Taddei et al., 2008). Thus, MaSC divisions are important regulators of physiological and pathological stem cell biology. However, the precise molecular mechanisms underlying the division modes in mitotic MaSCs are still not understood.

The mitotic spindle is a key component of cell division. The position and orientation of the mitotic spindle are orchestrated by forces generated in the cell cortex (Grill and Hyman, 2005), where astral microtubules emanating from the mitotic spindle pole are tethered to the plasma membrane (Siller and Doe, 2009). Spindle orientation is determined by an evolutionarily conserved pathway, including cytoplasmic dynein, dynactin, the nuclear mitotic apparatus (NUMA) protein, and the G protein regulator leucine-glycine-asparagine repeat (LGN) protein (the



vertebrate homolog of *Caenorhabditis elegans* G protein-coupled receptor (GPR-1)/GPR-2 and *Drosophila* protein-protein interaction networks [PINS]) (Morin and Bellaïche, 2011). During cell division, LGN is recruited to the cell cortex through glycosyl phosphatidylinositol-linked $G_{\alpha i}/G_{\alpha o}$, which binds LGN carboxy-terminal GoLoco motifs (Zheng et al., 2010). Polarity cues restrict LGN localization to specific subcortical domains, where LGN recruits NUMA (Peyre et al., 2011). NUMA in turn interacts with microtubules and with the cytoplasmic dynein/dynactin complex. The precise localization of these interactions at the cell cortex ensures the positioning of the mitotic spindle through cortical capture of astral microtubules. Although these mechanisms have been well described in the skin and neuroepithelium, their involvement in the division of MaSCs is not known.

We previously showed that huntingtin (HTT), the protein mutated in Huntington's disease (HD), is required in murine neuronal progenitors for appropriate spindle orientation and for cell fate determination (Godin et al., 2010). Yet, the mechanisms underlying HTT function during spindle orientation remain unclear. HTT expression is not restricted to the brain: mutant HTT is detected in healthy mammary tissue and mammary tumors where it regulates tumor progression (Moreira Sousa et al., 2013). Thus, HTT may contribute to spindle orientation and cell fate choices outside the nervous system. Here, we investigated the function of HTT in mitosis of MaSCs during mouse mammary epithelium morphogenesis.

RESULTS

In Vivo Depletion of HTT from the Basal Compartment Leads to a Decreased Epithelial Content and Alters Self-Renewal of the Basal and Luminal Progenitors

We analyzed the expression pattern of wild-type HTT in mammary glands from virgin mice by immunohistochemistry. HTT immunoreactivity was observed in the basal and luminal compartments and increased as differentiation progressed (Figure 1A). We isolated basal and luminal epithelial cells from wild-type mice using flow cytometry (Figure S1A available online; Table S1). Evaluation of basal (*Krt14*) and luminal (*Krt18*) marker expression by quantitative real-time RT-PCR confirmed that BCs and LCs were found in the CD24-low/ $\alpha 6$ -high and CD24-high/ $\alpha 6$ -low fractions, respectively (Figure S1B). HTT was detected in BCs and LCs, but the signal was strongest in the luminal fraction (Figure 1B).

To test whether HTT regulates BC division and differentiation, we deleted HTT from the basal cell layer of the mammary epithelium by crossing *Htt^{fllox/fllox}* mice harboring

floxed *Htt* alleles (Dragatsis et al., 2000) with transgenic mice expressing *Cre* recombinase under the control of the keratin 5 (K5) promoter (Ramirez et al., 2004). *Cre* expression was mostly confined to the basal cell population (Figure S1C). We analyzed the distribution of HTT-deficient cells in mutant mammary epithelium by crossing *K5Cre;Htt^{fllox/fllox}* mice with the *Rosa26-LacZ* reporter mouse strain (R26). At age 12 weeks, virtually all BCs were *LacZ* positive, whereas only 32% of LCs expressed *LacZ* (Figure 1C). The *LacZ*-negative LC population in the mutant epithelium may originate during early stages of gland development, from *LacZ*-negative BCs and from *LacZ*-negative cells committed to luminal differentiation that switched off the K5 promoter and escaped HTT deletion. Indeed, in embryonic day 18 (E18) *K5Cre;Htt^{fllox/fllox};R26* embryos, a majority of cells in the central part of the developing mammary ducts did not express the *Cre* recombinase (Figure S1D). These cells expressed keratin 8 (K8) and were negative for K5, thus displaying luminal features (Figure S1E). Alternatively, the *LacZ*-negative LC population in the mutant epithelium may originate during adulthood from bipotent myoepithelial and luminal stem cells (Rios et al., 2014). *Htt* transcript levels were 79% lower in mutant than wild-type BCs (Figure 1D). In LCs from mutant mammary epithelium, *Htt* expression levels were 39% lower than the control value (Figure 1D).

Fewer epithelial cells could be isolated from the mutant than control mammary glands (Figures 1E and 1F). Also, the ratio between basal and LC populations was altered in mutant mammary epithelium (Figure 1G). We then performed a functional evaluation of progenitor cell content in control and mutant BCs using colony-formation assay. Mutant BCs formed significantly less colonies than control cells ($0.84\% \pm 0.23\%$ versus $3.32\% \pm 0.3\%$, Figure 1H). Similarly, the HTT-depleted LCs failed to form clonal colonies as compared to the control LC population ($1.55\% \pm 0.72\%$ versus $18.6\% \pm 2.3\%$, Figure 1I). Thus, K5-driven depletion of HTT leads to gland hypoplasia and affects colony-forming stem/progenitor populations in basal and luminal compartments.

HTT Is Required for Basal and LC Specification

We then analyzed the transcripts of genes associated with proliferation and myoepithelial and luminal lineages (Figure 2A; Table S1). The lower than control levels of the cell proliferation marker *Ki67* in BCs and LCs from mutant glands were consistent with the decrease in the overall population of epithelial cells. In the basal compartment in mutants, whereas *Krt18* was upregulated, *Krt14* and *Trp63* were differentially regulated with *Krt14* being increased and *Trp63* decreased (Figure 2A). In LCs from the mutant glands, both *Krt14* and *Trp63* were increased, whereas *Krt18* was decreased. Also, the expression levels of the

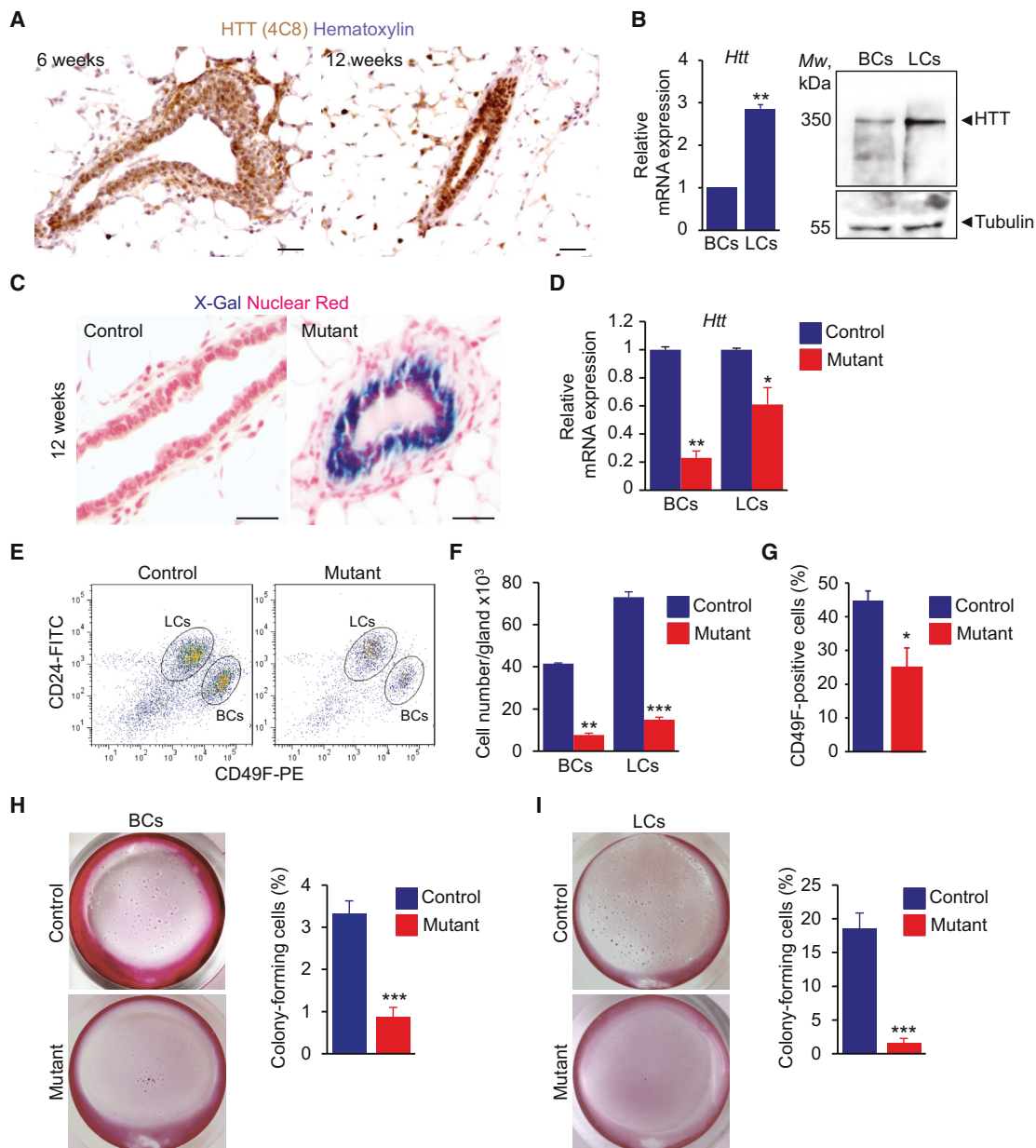


Figure 1. K5-Driven Loss of HTT Affects Basal and LC Populations

(A) Mammary gland sections from virgin C57Bl6/J mice stained for HTT.

(B) Quantitative real-time RT-PCR analysis of *Htt* gene and western blotting for HTT protein in basal and luminal mammary epithelial cells from 16-week-old virgin mice. Mw, molecular weight.

(C) *LacZ*-stained mammary gland sections from 12-week-old virgin control and mutant *K5Cre;Htt^{flax/flax};R26* 12-week-old virgin mice.

(D) Quantitative real-time RT-PCR analysis of *Htt* gene expression in BCs and LCs from 16-week-old virgin mice.

(E) Representative dot plots showing separation of luminal ($CD31^{-}/CD45^{-}/CD24^{+}/CD49F$ -low) and basal ($CD31^{-}/CD45^{-}/CD24^{+}/CD49F$ -high) epithelial cells from 16-week-old virgin mouse mammary glands by flow cytometry.

(F) Number of BCs and LCs isolated per gland of 16-week-old virgin mice.

(G) Percentages of CD49F-high cells in $CD45^{-}/CD31^{-}/CD24^{+}$ cell populations.

(H and I) Colonies formed by BCs (H) and LCs (I) isolated from mammary glands of 16-week-old virgin mice.

Scale bars, 50 μ m (A and C). Error bars, SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. See also Figure S1 and Table S1.

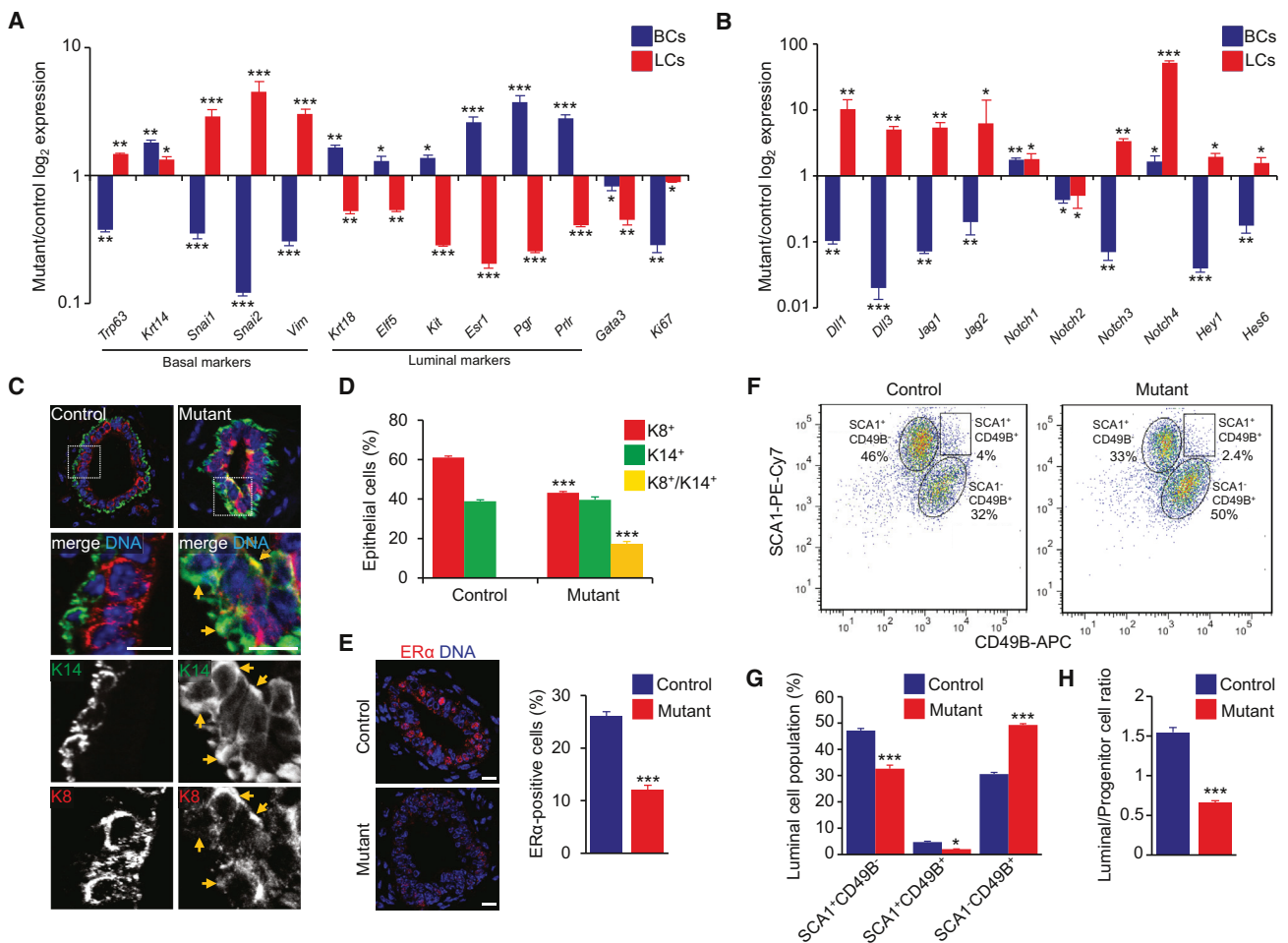


Figure 2. Loss of HTT Alters Basal to Luminal Specification

(A and B) Quantitative real-time RT-PCR analysis of the indicated genes in BCs and LCs from 16-week-old mice. (C) Sections from 12-week-old mammary glands stained for K14 and K8. Arrows point to K8⁺K14⁺ epithelial cells. (D) Percentage of K8⁺, K14⁺, and K8⁺K14⁺ cells. (E) Sections from 12-week-old mammary glands stained for ERα. Right panel shows the percentages of ERα-positive cells. (F) Representative dot plots showing the frequency of SCA1⁺ and CD49B⁺ cells in the LC population in 16-week-old virgin mice. (G) Percentages of SCA1⁺CD49B⁻, SCA1⁺CD49B⁺, and SCA1⁻CD49B⁺ cells. (H) Ratio of SCA1⁺CD49B⁻-to-SCA1⁻CD49B⁺ cells. Scale bars, 10 μm. Error bars, SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. See also Table S1.

epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-related genes (*Snai1*, *Snai2*, and *Vim*) were decreased in mutant BCs and increased in mutant LCs as compared to control cells (Figure 2A). We tested luminal markers: mutant LCs displayed a marked decrease in the expression levels of mature LC genes (*Esr1*, *Pgr*, and *Pitr*) as compared to control cells (Figure 2A). The expression levels of *Elf5* and *Kit* transcripts that are markers of the luminal progenitor-enriched population were also significantly lower in mutant LCs than in control. This was sustained by the decreased expression of the transcription factor *Gata3* in mutant BCs and LCs (Figure 2A). Finally, mutant BCs expressed higher levels

of luminal markers as compared to control cells (Figure 2A). Thus, the K5-driven loss of HTT affects the proliferative potential and the identity of BC and LC populations.

NOTCH signaling is involved in cell fate determination in the mammary epithelium (Bouras et al., 2008; Yalcin-Ozuysal et al., 2010). We thus assayed the mRNAs of the *Notch* ligands (*Dll1*, *Dll3*, *Jag1*, and *Jag2*), the *Notch1–Notch4* receptors, and the *Hey1* and *Hes6* target genes (Figure 2B). The NOTCH pathway was downregulated in BCs and overactivated in LCs from mutant mice, relative to controls. Immunohistochemical labeling of 12-week-old mammary glands for K14 and K8 further confirmed that



basal and luminal specifications were altered in HTT-deficient mice (Figure 2C). HTT-depleted mammary ducts exhibited an unusual expansion of K14⁺K8⁺ double-positive cells ($17.2\% \pm 1.32\%$, Figure 2D).

The overall increase in NOTCH signaling in the luminal compartment suggested that the absence of HTT may inhibit LC fate acquisition. Indeed, the proportion of estrogen receptor (ER) α -expressing cells decreased in mutant epithelia as compared to controls (Figure 2E). We next analyzed the luminal subpopulations by flow cytometry based on the expression of CD49B and SCA1 (Figures 2F and 2G). The SCA1⁺CD49B⁻ population consists of mature LCs, whereas the SCA1⁻CD49B⁺ cells are luminal progenitor cells (Shehata et al., 2012). A high proportion of the luminal population in control epithelium was SCA1⁺CD49B⁻ ($47.2\% \pm 0.8\%$ versus $30.6\% \pm 0.6\%$ for the SCA1⁻CD49B⁺ population). In mutant conditions, the SCA1⁻CD49B⁺ luminal subpopulation was much larger ($49.3\% \pm 0.4\%$ versus $32.6\% \pm 1.3\%$ for the SCA1⁺CD49B⁻ population). Accordingly, the ratio of mature LCs to progenitors was lower in the mutant luminal fraction as compared to controls (Figure 2H). This indicates that K5-driven HTT depletion decreases the capacity of the basal and luminal compartments to properly commit to a myoepithelial or LC fate.

HTT Regulates Mammary Epithelial Morphogenesis during Pregnancy and Lactation

We investigated differentiation of mammary glands on day 18.5 of pregnancy and day 1 of lactation when HTT was strongly expressed (Figure S2A). There were fewer secretory alveoli in mutant than control glands, and the epithelial content was lower (Figures 3A and 3B). Notably, there were fewer well-developed alveoli in mutant than control glands. This was confirmed by analysis of *lacZ* reporter expression in K5Cre;Htt^{fllox/fllox};R26 mammary glands (Figure S2B). On day 7.5 of pregnancy, most LCs in ducts and alveolus-like structures in mutant glands stained blue with X-gal, with only a few *lacZ*-negative cells detected. The number of *lacZ*-negative cells was higher during pregnancy and lactation; also, on day 1 of lactation, the well-differentiated newly formed alveoli were *lacZ* negative (Figure S2B).

On day 18.5 of pregnancy and day 1 of lactation, Ki67 labeling indicated a higher rate of proliferation for mutant than control alveolar cells (Figure S2C). The formation of the lumen involves apoptosis, which was also affected by HTT depletion. On day 14.5 of pregnancy, there were more cells but less apoptosis in the lumen of mutant than control glands (data not shown). On day 18.5 of pregnancy and day 1 of lactation when the lumens are fully generated, there was no detectable apoptosis in controls (Figure S2D). In contrast, mutant alveoli still displayed cleaved caspase-

3-positive cells in their lumen, suggesting a delay in lumen formation.

On day 18.5 of pregnancy, the mutant alveoli were poorly differentiated, containing few milk droplets (Figure 3A). In controls, the large cytoplasmic lipid droplets in the luminal alveolar cells on day 18.5 of pregnancy were replaced by small lipid droplets at the luminal surface on day 1 of lactation. In mutant mammary glands, the large cytoplasmic droplets remained in the alveolar cells on day 1 of lactation (Figure 3B, arrows), indicating secretory dysfunction. We investigated the subcellular localization of signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A) on 1 day of lactation (Figure 3C). Upon activation by prolactin, nuclear phosphorylated STAT5A (p-STAT5A) regulates the expression of genes involved in lobulo-alveolar differentiation and lactation (Jahchan et al., 2012). Mutant alveolar cells displayed less nuclear p-STAT5A than control glands. Consistent with this, the milk Whey acid protein (WAP) immunolabeling and the levels of the RNAs for the milk proteins β -casein (*Csn2*) and WAP (*Wap*) were lower in mutant than control glands (Figure 3D).

Because the overall architecture of mutant glands showed abnormalities, we tested whether epithelial cell polarity was affected. We analyzed the localization of ZO1 (zonula occludens 1), PAR3 (Partitioning Defective 3), aPKC (atypical protein kinase C), and E-cadherin in LCs on 18.5 day of pregnancy (Figure 3E). In control glands, PAR3 and ZO1 colocalized at the tight junctions of LCs, whereas in mutant alveoli, the labeling was more diffuse, and PAR3 accumulated in the cytoplasm (Figure 3E). E-cadherin, which was enriched at the lateral compartment in control LCs, accumulated with aPKC at the apical surface of mutant cells (Figure 3E). K8⁺ LCs were distinguishable from K14⁺ BCs in control alveoli, whereas both K8 and K14 immunoreactivities showed substantially abnormal patterns in mutant glands (Figure 3F). Thus, the absence of HTT alters morphological and functional differentiation, epithelial polarization, and milk production during alveologenesis.

HTT Controls Mitotic Spindle Orientation in Mouse Mammary Basal Cells

Next, we addressed potential mechanisms by which HTT may regulate mammary gland morphogenesis. HTT regulates the mitotic spindle positioning in mouse neuronal progenitors (Godin et al., 2010). We analyzed the division of BCs in ducts from the outgrowths that developed on day 7.5 of pregnancy when the stimuli of pregnancy induce basal cell division to ensure mammary gland growth (Taddei et al., 2008). HTT was observed at the spindle poles during metaphase and at the cortical area in metaphase and anaphase (Figure 4A). Similarly to what is

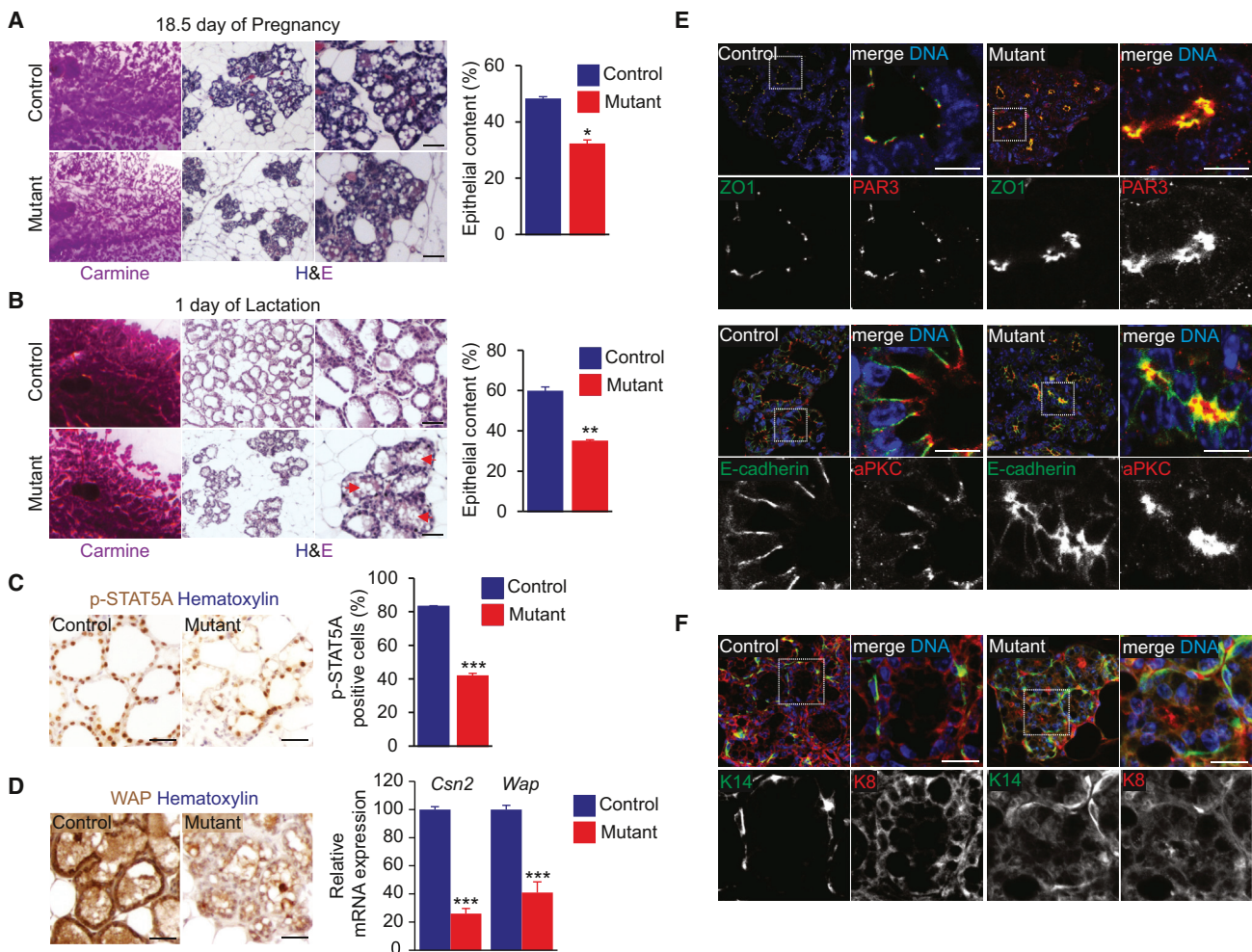


Figure 3. HTT Is Required for Epithelial Morphogenesis during Pregnancy and Lactation

(A and B) Carmine-stained whole mounts of mammary glands and hematoxylin and eosin staining (H&E) at low (middle) and high (right) magnifications. The histograms show the quantification of the epithelial content.

(C) Mammary gland sections stained for p-STAT5A and percentages of p-STAT5A-positive cells.

(D) Mammary gland sections from 1-day lactating mice stained for WAP and quantitative real-time RT-PCR analysis of *Csn2* and *Wap* gene expression.

(E and F) Mammary gland sections from 18.5-day pregnant mice stained as indicated. Scale bars, 10 μ m.

Scale bars, 50 μ m (A–D). Error bars, SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. See also Figure S2.

observed in cultured cells (below) (Godin et al., 2010), HTT labeling was also present at the spindle midbody area during anaphase and telophase.

In dividing epithelial cells, the mitotic spindle undergoes a rapid phase of rotation during early metaphase until it reaches a planar orientation, followed by a longer phase of planar maintenance until anaphase onset (Peyre et al., 2011). We evaluated the orientation of the mitotic spindle during metaphase and telophase (Figures 4B and 4C). In control BCs, most metaphase and telophase cells (71% and 74%, respectively) displayed spindle angles between 0° and 15° (planar/horizontal division) (Figures 4D–4F).

The spindle angles were randomized in mutant BCs, with a majority of cells displaying oblique and vertical divisions. These findings indicate that HTT is required for correct spindle orientation in dividing mammary BCs.

HTT Modulates Mitotic Spindle Orientation in Mammary Epithelial Cells in a Dynein-Dependent Manner

We used human basal-like MCF-10A mammary cells to investigate the mechanisms underlying the function of HTT in spindle orientation. Cells were transfected with si-Control, si-HTT1 targeting HTT, or si-dynein targeting the



heavy chain of the dynein complex (Figure 4G). The amount of HTT at the spindle poles was affected by both small interfering RNAs (siRNAs) (Figure 4H). We analyzed the position of the spindle poles with respect to the substratum plane (Figures S3A, S3B, and 4I). In control cells, virtually all spindles were parallel to the substratum plane ($3.5^\circ \pm 0.2^\circ$) (Figure 4I). In contrast, most HTT-depleted and dynein-depleted cells failed to align their spindle with the substratum plane ($16.5^\circ \pm 0.4^\circ$ and $20.3^\circ \pm 0.6^\circ$, respectively) (Figure 4I).

We also reduced HTT levels using si-HTT2, whose target sequence in HTT is different from that of si-HTT1 (Figure 4J). Again, a misoriented spindle was observed following the use of si-HTT2 (Figure 4K). Next, we introduced a construct encoding a full-length HTT (HTTFL; Figures 4J) (Pardo et al., 2010). si-HTT2 was designed to inhibit the expression of endogenous HTT but had no effect on the expression of the HTTFL construct (Figure 4J) (Pardo et al., 2010). Expression of the HTTFL restored the spindle orientation defect caused by si-HTT2 to the control situation (Figures 4K and S3A).

HTT interacts with dynein in neurons (Caviston et al., 2007; Gauthier et al., 2004), so HTT and dynein may act together to regulate spindle orientation. We depleted endogenous HTT using si-HTT2 and expressed a variant of HTTFL devoid of its dynein-interacting domain (HTTΔDYN) and unable to bind dynein (Pardo et al., 2010) (Figure 4J). HTTΔDYN was mislocalized from the spindle poles (Figures 4L and S3A) and failed to rescue the spindle orientation defect induced by si-HTT2 (Figures 4K and S3A).

We also investigated cell-cycle progression by video recording cells stably expressing fluorescent histone 2B (Cherry) and α -tubulin (GFP) (Figure S3C; Movies S1 and S2). The duration of mitosis was similar in si-HTT1-transfected and control cells (Figure S3C), although HTT depletion led to an alteration in spindle orientation (Figures S3C–S3E). Notably, the spindle angles measured from live-imaging data were higher than those from fixed-cell samples (Figures 4I, 4K, and S3D). Possibly, the angle can be underestimated in fixed samples due to drying effects causing flattening of the sample. These observations show that HTT regulates spindle orientation in mammary cells by a mechanism that involves its interaction with dynein.

HTT Forms a Complex with Dynein/Dynactin/NUMA/LGN in Dividing Mammary Epithelial Cells

We investigated the nature of the molecular machinery involved in the function of HTT during spindle orientation. During interphase, HTT showed a punctate distribution in the cytosol (Figure 5A). During mitosis from prophase to late anaphase, spindle poles became enriched

in HTT. HTT displayed punctate staining beneath the cellular cortex reminiscent of astral microtubules plus ends at prometaphase and metaphase. HTT was also present at the spindle midzone during anaphase and telophase (Figure 5A). Other anti-HTT antibodies gave similar findings (Figure S4A).

The dynein/dynactin complex is required for the assembly of the spindle, and it is also essential at the cell cortex to exert pulling forces on astral microtubules (Morin and Bellaïche, 2011). LGN is necessary for planar spindle orientation (Konno et al., 2008; Morin et al., 2007). To study the localization of HTT, P150^{Glued}, dynein, NUMA, and LGN at the spindle and cellular cortex, we used a fixation procedure including incubation in anhydrous methanol containing 2% paraformaldehyde to maintain the integrity of microtubules emanating from the spindle poles (Figure 5B). We found that HTT colocalized with P150^{Glued}, dynein, and NUMA at the spindle and spindle poles (Figure 5B). HTT, P150^{Glued}, dynein, and NUMA were also detected on astral microtubules and microtubule plus ends. LGN formed a typical crescent shape at the cell cortex and colocalized with HTT at the spindle pole (Figure 5B). Immunoprecipitation of HTT from MCF-10A cells synchronized at metaphase led to the coimmunoprecipitation of NUMA, P150^{Glued}, dynein, and LGN (Figure 5C). However, G_{ai}/G_{zo} did not coimmunoprecipitate with HTT (Figure S4B). Because G_{ai}/G_{zo} localization is restricted to the cell cortex, this suggests that HTT is not stably associated with the cell cortex. Thus, HTT is part of the dynein/dynactin/NUMA/LGN complex at the spindle poles and along astral microtubules and may regulate its microtubule-based delivery from the spindle poles to the cell cortex (Figure 5D).

HTT Is Required for the Cortical Localization of Dynein, Dynactin, NUMA, and LGN during Mitosis

We analyzed the influence of HTT on the mitotic localization of NUMA, P150^{Glued}, dynein, and LGN. NUMA colocalized with P150^{Glued}, dynactin, and LGN at the spindle poles and formed cortical crescents facing the spindle poles during metaphase (Figure 6A). HTT depletion affected the localization of P150^{Glued}, dynein, NUMA, and LGN: these proteins relocated from the cell cortex to accumulate at the spindle poles (Figures 6A–6D). Expression of the HTTFL restored the cortical distribution defect of P150^{Glued}, dynein, NUMA, and LGN caused by si-HTT2 to the control situation (Figures S5A–S5D). However, HTTΔDYN failed to do so. We then analyzed the distribution of HTT partners in vivo in control and HTT-depleted dividing BCs. HTT depletion resulted in fewer BCs displaying cortical accumulation of NUMA ($27\% \pm 5.1\%$ versus $73\% \pm 2.6\%$) and LGN ($21\% \pm 3.3\%$ versus $68\% \pm 4.7\%$) during metaphase (Figure 6E). These data implicate HTT in the delivery of

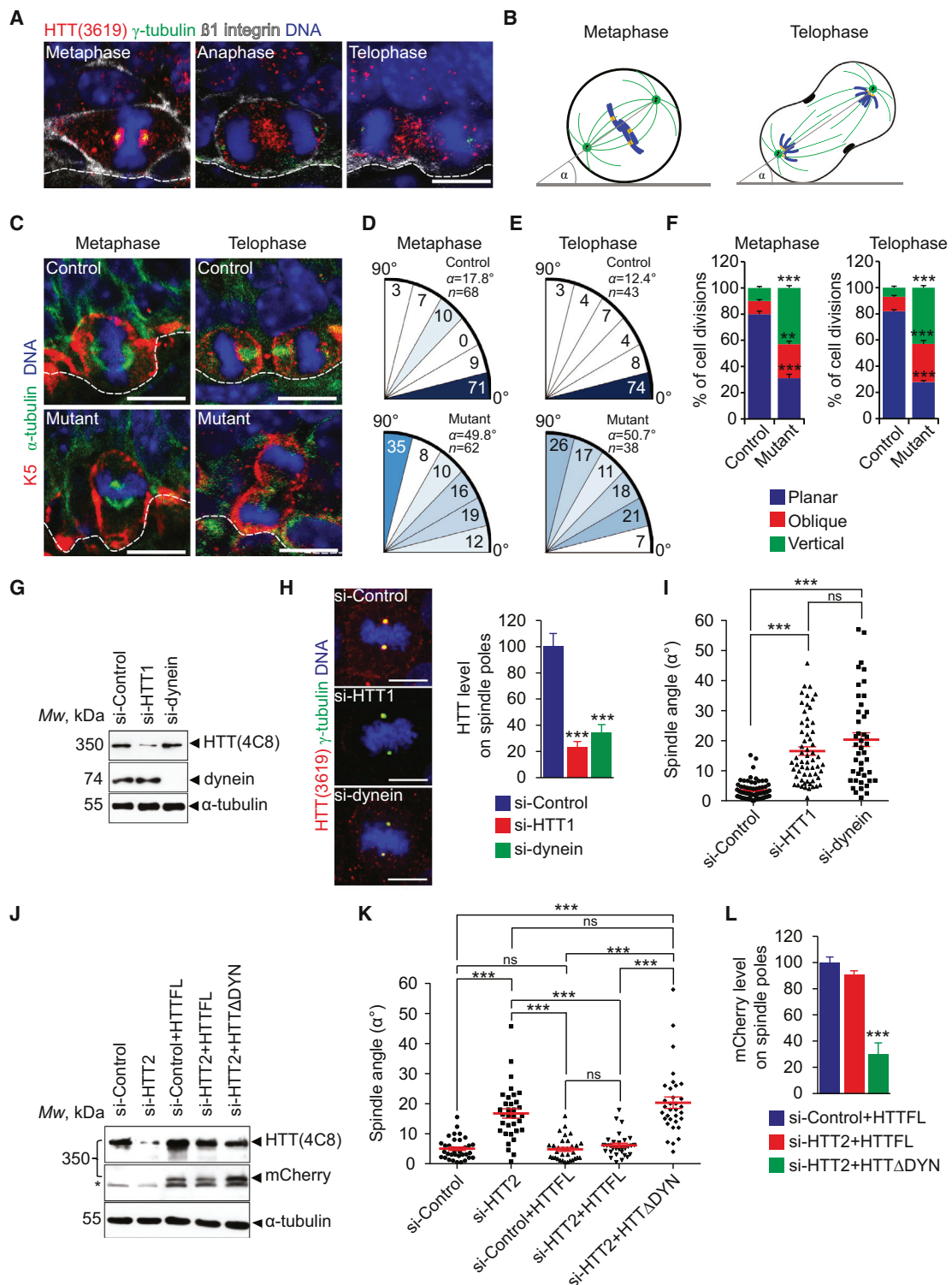


Figure 4. HTT Regulates Mitotic Spindle Orientation in Basal Cells in a Dynein-Dependent Manner

(A) Mammary gland sections from 7.5-day pregnant mice.

(B) Schemes illustrating measurement of the spindle angle α .

(C) Mammary gland sections from 7.5-day pregnant mice.

(legend continued on next page)

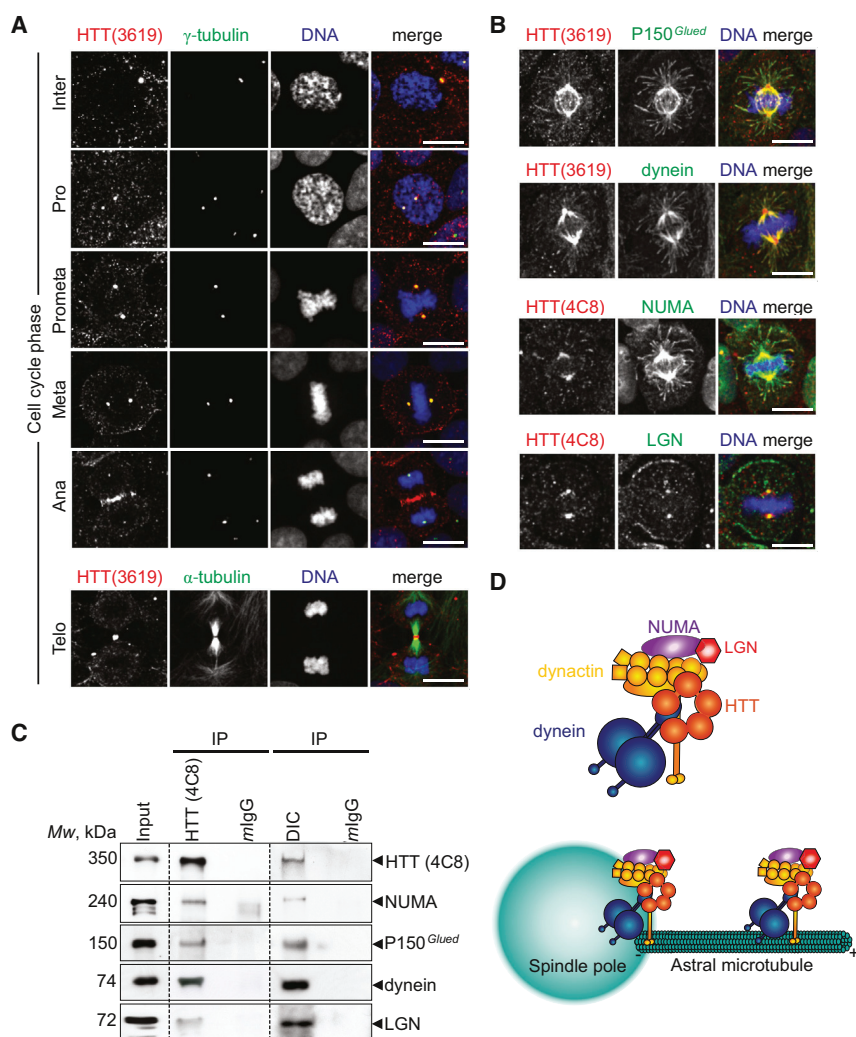


Figure 5. HTT Codistributes with Dynein/Dynactin/NUMA/LGN

(A and B) Mammary cells stained as indicated. Scale bars, 10 μ m. Telo, telophase; Ana, anaphase; Meta, metaphase; Prometa, prometaphase; Pro, prophase; Inter, interphase.

(C) HTT/dynein/dynactin/NUMA/LGN complexes were immunoprecipitated from cells arrested in metaphase before lysis. Mouse IgG (mIgG) was used as a negative control. The immunoprecipitates (IP) were analyzed by western blotting.

(D) Cartoon showing the HTT/dynein/dynactin/NUMA/LGN complex at the spindle pole and on astral microtubules in metaphase cells.

See also Figure S4.

P150^{Glued}, dynein, NUMA, and LGN to the cell cortex during mitosis.

To confirm this possibility, we performed live-cell imaging of HeLa cells stably expressing the dynein heavy chain or LGN fused to GFP (DHC-GFP and GFP-LGN; Figure 6F; Movies S3, S4, S5, and S6). During mitosis, dynein oscillates from one pole of the cell cortex to the other, generating

asymmetric forces that center the spindle (Kiyomitsu and Cheeseman, 2012). In control cells, DHC-GFP was distributed asymmetrically with respect to both the cell cortex and the mitotic spindle during metaphase, and then relocalized symmetrically at anaphase onset, until telophase (Figures 6F and 6G). HTT depletion impaired the dynamics of DHC-GFP localization at the cell cortex, and the

(D and E) Spindle angles of basal cells; values are expressed as a percentage of basal cells within each interval. Mean angle and number of measures (n) are shown.

(F) Percentages of planar (0°–30°), oblique (30°–60°), and vertical (60°–90°) divisions.

(G) Western blotting of mammary cell extracts.

(H) HTT abundance at spindle poles (right).

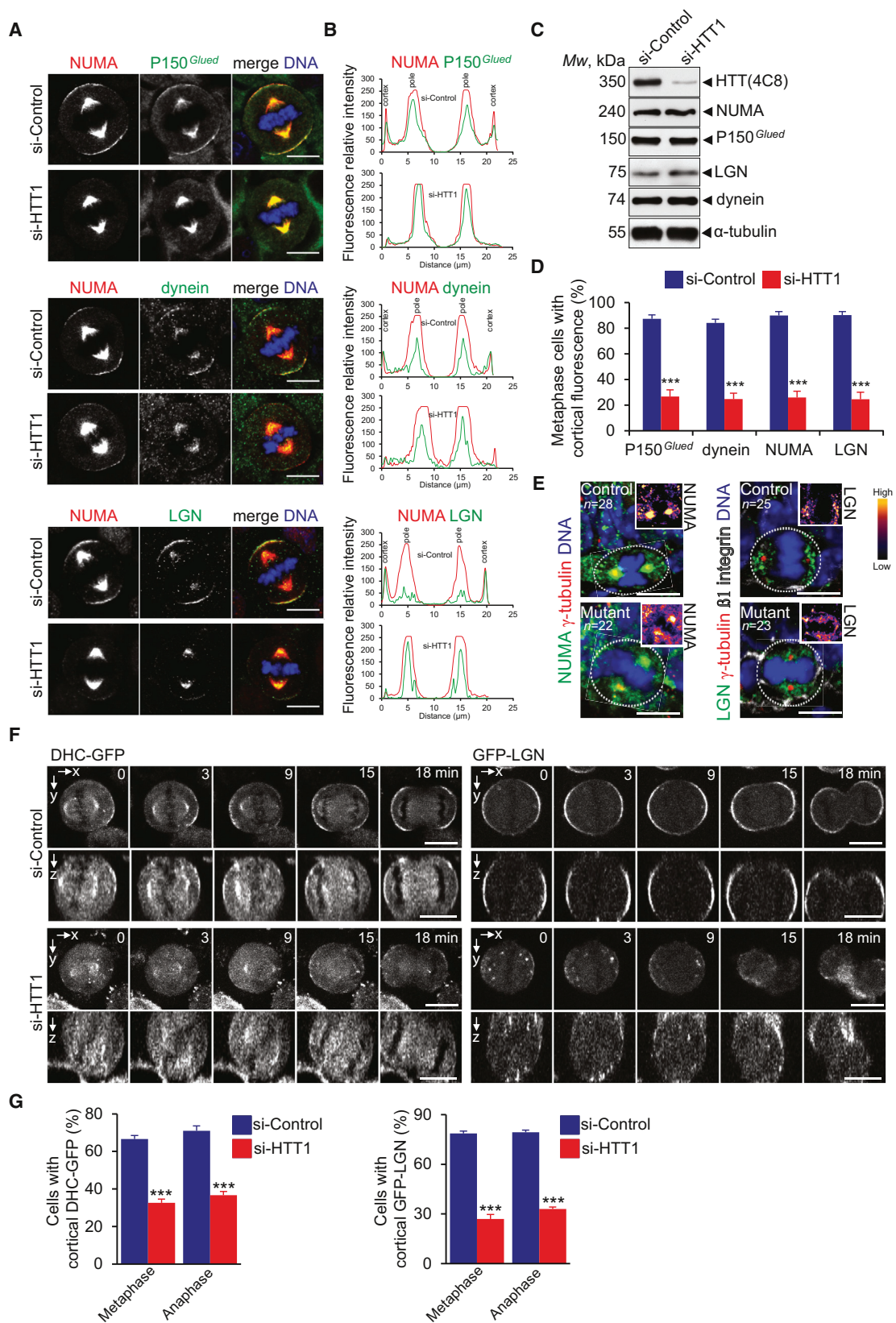
(I) Distribution and mean spindle angle in metaphase mammary cells.

(J) Western blotting of cell extracts. The star indicates a contaminating band.

(K) Distribution and mean spindle angles in metaphase mammary cells.

(L) HTT (mCherry) labeling at spindle poles in metaphase mammary cells.

Scale bars, 10 μ m. Error bars, SEM. ns, not significant. **p < 0.01. ***p < 0.001. See also Figure S3.



(legend on next page)



proportion of HTT-depleted cells displaying cortical DHC-GFP was low in metaphase ($32.7\% \pm 2.6\%$ versus $66.7\% \pm 1.8\%$ for controls) and anaphase ($36.7\% \pm 2.1\%$ versus $71\% \pm 1.9\%$). Remarkably, cortical accumulation of GFP-LGN was decreased in HTT-depleted cells compared to control cells where GFP-LGN formed a bipolar cortical crescent from metaphase to anaphase (Figure 6F). The proportions of cells displaying cortical accumulation of GFP-LGN in metaphase and anaphase were lower in si-HTT-transfected than control cells ($27\% \pm 2.7\%$ versus $78.7\% \pm 1.4\%$ and $33\% \pm 1.1\%$ versus $79.3\% \pm 1.3\%$) (Figure 6G). These effects were confirmed by z stack analysis (Figure 6F). We conclude that HTT regulates the dynamics of the dynein/dynactin/NUMA/LGN complex, therefore ensuring its cortical localization.

HTT-Mediated Transport of the Dynein/Dynactin/NUMA/LGN Complex from the Spindle Poles to the Cell Cortex Involves Kinesin 1

HTT interacts with kinesin 1 (KIF5) through the huntingtin-associated protein 1 (HAP1) to promote microtubule-based anterograde vesicular transport in neurons (Colin et al., 2008; Gauthier et al., 2004; McGuire et al., 2006; Shirasaki et al., 2012). Furthermore, HTT transports brain-derived neurotrophic factor (BDNF) vesicles in an anterograde manner, and BDNF anterograde transport depends specifically on kinesin 1, and not kinesin 2 (Dompiere et al., 2007; Gauthier et al., 2004). We hypothesized that kinesin 1 could mediate the HTT-dependent anterograde transport of P150^{Glued}, dynein, NUMA, and LGN from the spindle poles to the cell cortex. HTT colocalized with kinesin 1 on the spindle poles, mitotic spindle, and astral microtubules in metaphase cells (Figure 7A). Immunoprecipitation of HTT from metaphase-synchronized MCF-10A cells led to the coimmunoprecipitation of kinesin 1 (Figure 7B). HTT depletion impaired the recruitment of kinesin 1 on the spindle poles and astral microtubules (Figures 7C–7E). Conversely, si-kinesin 1 treatment altered the localization of P150^{Glued}, dynein, and NUMA on astral microtubules and that of LGN at the cell cortex (Figures 7F–7I).

Finally, we tested whether the recruitment of P150^{Glued}, dynein, NUMA, and LGN to the cell cortex was microtubule dependent by treating cells with 40 nM of nocodazole

to disrupt astral microtubules (data not shown). Disruption of astral microtubules altered the recruitment of HTT, P150^{Glued}, dynein, NUMA, and LGN to the spindle poles (Figures S6A–S6D) and of P150^{Glued}, dynein, NUMA, and LGN to the cell cortex (Figures S6C and S6E). In the majority of the cells still displaying cortical LGN, LGN was distributed more randomly on the entire cell cortex and not restricted to a bipolar cortical crescent facing the poles as in the control situation (Figures S6C and S6F). This indicates that astral microtubules are required for the establishment of the bipolar symmetrical cortical distribution of LGN during metaphase. Together, these findings support the idea that HTT regulates the dynamics of the dynein/dynactin/NUMA/LGN complex along astral microtubules through kinesin 1 (Figure 7J).

DISCUSSION

Our studies shed light on the role of HTT as a modulator of the mammary epithelial morphogenesis and of spindle orientation in MaSCs. HTT is not only crucial for spindle pole assembly but also for the cortical localization of the dynein/dynactin/NUMA/LGN complex. HTT may be a molecular link between the dynein/dynactin and NUMA/LGN pathways ensuring the transport of the dynein/dynactin/NUMA/LGN complex from the spindle pole to the cell cortex. Indeed, we identify kinesin 1 as a molecular plus-end motor regulating the trafficking of the dynein/dynactin/NUMA/LGN complex to the cell cortex during mitosis. We propose a model in which HTT regulates MaSC division through this complex, with consequences for self-renewal and tissue cell fate specification and architecture. However, this does not exclude that HTT may also affect mammary gland morphogenesis by impairing directly luminal differentiation.

In vertebrates, a correlation between spindle orientation and the acquisition of cell fate has been proposed for the division of skin progenitors (Williams et al., 2011) and neuronal radial glial cells (reviewed in Morin and Bellaïche, 2011; Peyre and Morin, 2012; Shitamukai and Matsuzaki, 2012). This proposal is based on the observation that a loss of function of several proteins known to control

Figure 6. Loss of HTT Prevents Cortical Accumulation of Dynein-Dynactin-NUMA-LGN during Mitosis

- (A) Mammary cells stained as indicated.
 - (B) Line-scan analysis (relative fluorescence intensity).
 - (C) Western blotting of cell extracts.
 - (D) Percentage of cells with cortical accumulation of dynein, P150^{Glued}, NUMA, and LGN.
 - (E) Mammary gland sections from 7.5-day pregnant mice. Gradients of color intensity were applied to NUMA and LGN stainings (insets).
 - (F) DHC-GFP and GFP-LGN HeLa cells were video recorded. Maximum intensity and z projections are shown.
 - (G) Percentage of HeLa cells with cortical accumulation of DHC and LGN.
- Scale bars, 10 μ m. Error bars, SEM. *** $p < 0.001$. See also Figure S5 and Movies S3, S4, S5, and S6.

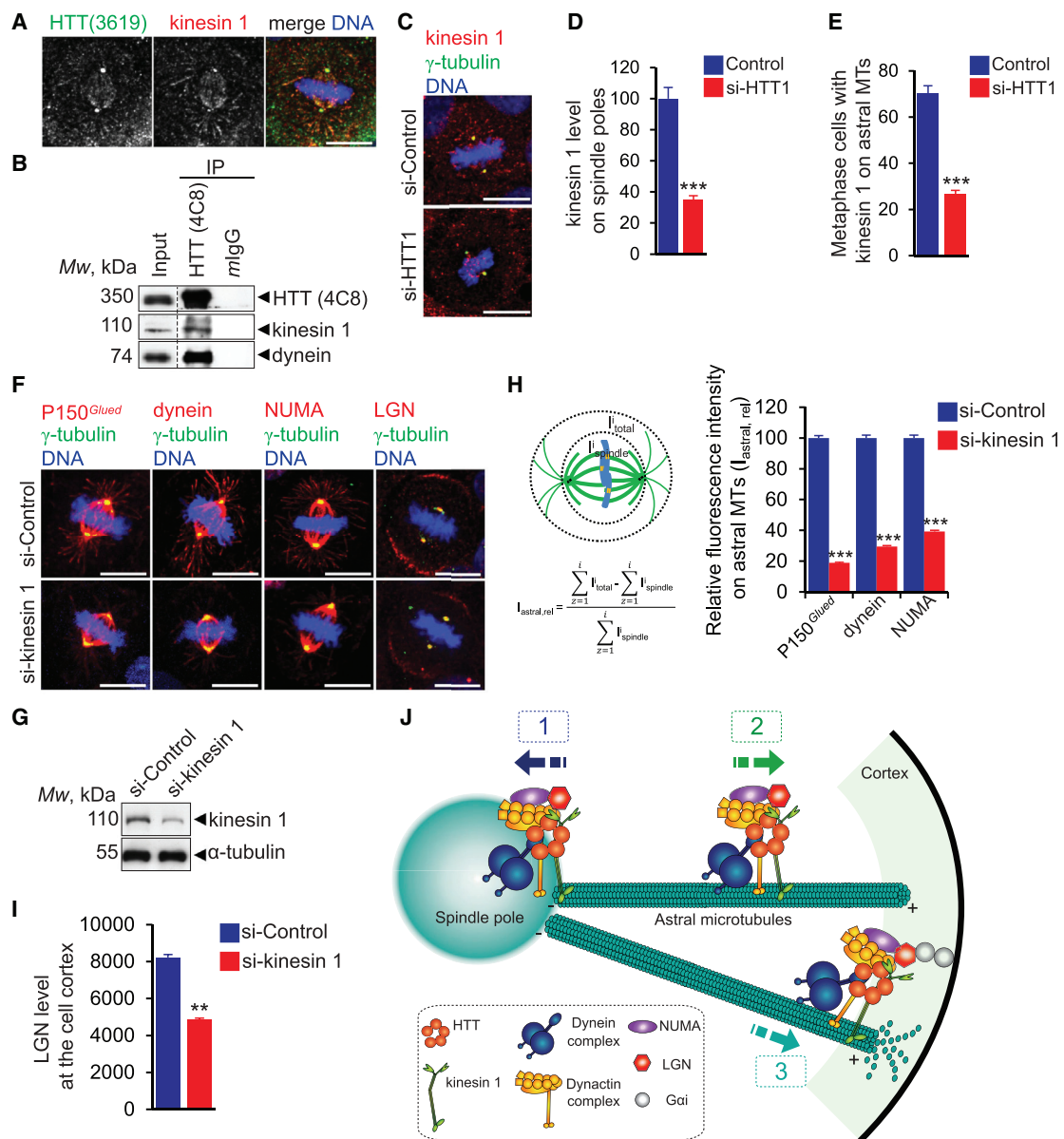


Figure 7. Kinesin 1 Participates in HTT-Mediated Cortical Localization of the Dynein/Dynactin/NUMA/LGN Complex during Mitosis

(A) Mammary cells stained as indicated.

(B) HTT/dynein/kinesin 1 complexes were immunoprecipitated from cells arrested in metaphase before lysis. Mouse IgG (mIgG) was used as a negative control. The immunoprecipitates were analyzed by western blotting.

(C) Mammary cells stained as indicated.

(D) Kinesin 1 abundance at spindle poles.

(E) Percentages of cells with kinesin 1 on astral microtubules.

(F) Mammary cells stained as indicated.

(G) Western blotting of cell extracts.

(H) Quantification of the relative fluorescence intensities of P150^{Glued}, dynein, and NUMA on astral microtubules. The intensities of the spindle ($I_{spindle}$) and of the total cell (I_{total}) were determined with ImageJ software. Relative intensities on astral microtubules ($I_{astral, rel}$) were calculated, and control value was set to 100.

(I) LGN abundance at the cell cortex.

(legend continued on next page)



spindle orientation also leads to early differentiation. However, disruption of the LGN complex causes spindle randomization with little effect on differentiation (Konno et al., 2008; Morin et al., 2007; Peyre et al., 2011), suggesting that spindle orientation and fate choices may be regulated in parallel, rather than there being a causal relationship between them. During mammary gland maturation, MaSCs amplify their pool through symmetric divisions, and then switch to a differentiation phase during which they divide asymmetrically to produce a more committed daughter cell (Joshi et al., 2010). Spindle orientation may be a mechanism controlling the balance between symmetric and asymmetric division (Joshi et al., 2010; Regan et al., 2013; Taddei et al., 2008). We observed that deletion of HTT from the basal compartment reduced the global epithelial content as a result of the decrease in the pool of MaSCs. However, the randomization of spindle orientation did not accelerate final LC fate commitment but favored an intermediate luminal progenitor cell status. Our study thus provides further support for the idea that spindle orientation is instrumental for planar division and the maintenance of the pool of cells ensuring self-renewal. The influence of spindle orientation on cell fate specification may be less clear cut and depend on different factors including the nature of the epithelium and the developmental stage.

How can mitotic spindle orientation affect cell fate acquisition in the mammary gland? A recent study showed that Aurora A kinase regulates the orientation of the mitotic spindle and the location of the postmitotic cells, thereby influencing LC fate determination (Regan et al., 2013). The authors propose that Aurora A kinase favors planar divisions through active NOTCH signaling. We show that a loss of HTT impairs NOTCH signaling during LC fate determination. HTT is essential for the cortical localization of dynein/dynactin/NUMA/LGN. In mouse embryonic skin progenitors, the loss of LGN, NUMA, and dynactin impairs asymmetric division and inhibits NOTCH signaling, leading to defects in morphogenesis (Williams et al., 2011). In addition to its role in spindle orientation, HTT may also affect NOTCH signaling through the regulation of its inhibitor NUMB that plays a role in asymmetric cell divisions (Lancaster and Knoblich, 2012). In *Drosophila*, NUMB interacts with the PAR3-PAR6-aPKC polarity complex promoting NOTCH activation. HTT is found in complex with PAR3 and aPKC (Shirasaki et al., 2012) and could thus regulate their cortical localization with a consequent

effect on NOTCH signaling. Alternatively, HTT may act on NOTCH signaling through a mechanism involving endocytosis: HTT regulates endocytosis (Caviston et al., 2007; Velier et al., 1998), and NUMB and Adaptor Protein complex 1 and 2 (AP-1 and AP-2) are found in complex with HTT (Shirasaki et al., 2012). In fact, in *Drosophila*, NUMB antagonizes NOTCH signaling by influencing the recycling of NOTCH complexes via AP-1 and AP-2 (Cotton et al., 2013; Couturier et al., 2013).

HTT forms a complex with dynein and dynactin in neurons to promote axonal microtubule-based vesicular transport (Caviston et al., 2007; Gauthier et al., 2004). Here, we demonstrate that HTT regulates spindle orientation through its interaction with dynein. Dynein and dynactin are recruited to the cell cortex by the $G_{\alpha i}/G_{\alpha o}$ -LGN-NUMA complex where they generate pulling forces that control spindle position and orientation (Kiyomitsu and Cheeseman, 2012; Kotak et al., 2012; Woodard et al., 2010). During metaphase, a signal comprising the spindle pole-localized polo-like kinase 1 (PLK1) regulates dynein localization by controlling the interaction between dynein/dynactin and its upstream cortical targeting factors NUMA and LGN (Kiyomitsu and Cheeseman, 2012). Dynein-dynactin movement to the astral microtubule plus ends involves CLIP-170 and LIS1 (Coquelle et al., 2002; Faulkner et al., 2000). In *Drosophila* neuroblasts, dynein and the plus-end motor KHC73/KIF13B act in synergy at microtubule plus ends to promote PINS-mediated spindle positioning (Lu and Prehoda, 2013). However, the microtubule-associated motors mediating dynein-dynactin transport to the astral microtubule plus ends are still unknown. We propose that LGN, NUMA, dynein, and dynactin are recruited to the cell cortex through an astral microtubule- and kinesin 1-dependent transport that is regulated by HTT. How this mechanism is coordinated in space and time with the other pathways remains to be determined.

Finally, the regulation of asymmetric/symmetric divisions is essential for the maintenance of stem cell populations, and it may also be key during tumorigenesis (Cicalese et al., 2009; Driessens et al., 2012; Quyn et al., 2010). In mammary tumoral tissues, symmetric divisions of cancer stem cells may contribute to tumor growth (Cicalese et al., 2009). Thus, our results not only open new lines of investigation for unraveling the mechanisms controlling stem cell self-renewal and cell fate specification in the mammary gland but may also have broader implications for the role of cell divisions in cancer biology.

(J) Model for HTT-mediated regulation of mitotic spindle orientation. During mitosis, HTT is targeted to the spindle poles through its interaction with dynein and promotes the accumulation of NUMA and LGN (1). HTT regulates the kinesin 1-dependent trafficking of dynein, dynactin, NUMA, and LGN along astral microtubules to the cell cortex (2). Once at the cell cortex, the dynein/dynactin/NUMA/LGN complex generates pulling forces on astral microtubules for mitotic spindle positioning (3).

Scale bars, 10 μ m. Error bars, SEM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. See also Figure S6.



EXPERIMENTAL PROCEDURES

Constructs, siRNAs, and Antibodies

A full description of constructs, siRNAs, antibodies, and cell lines is available in [Supplemental Experimental Procedures](#).

Immunostaining

To analyze HTT localization during mitosis, cells were prelysed 30 s in prewarmed 0.5% Triton X-100-PHEM buffer before fixation in anhydrous methanol at -20°C for 3 min and incubation with anti-HTT and anti- γ -tubulin antibodies. Alternatively, cells were fixed in anhydrous methanol at -20°C containing 2% paraformaldehyde (2 min). To visualize P150^{Glued}, dynein, NUMA, and LGN at spindle poles and cell cortex, cells were fixed with 10% trichloroacetic acid (7 min), then in cold methanol (-20°C for 10 min). Cells were immunostained with the various antibodies at 4°C (16 hr).

Pictures were captured with a 3D deconvolution imaging system or with a Leica SP5 laser-scanning confocal microscope. Images were treated with ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>; NIH).

Spindle Orientation, Quantification, and Image Analyses

Quantification of HTT, HTTFL, or HTT Δ YN at spindle poles was achieved using a 3D object counter plug-in (Bolte and Cordelières, 2006). The Line Scan function of ImageJ was used to reveal the relative fluorescence intensity of NUMA, P150^{Glued}, dynein, and LGN along a line crossing the spindle poles and the cell cortex. Spindle orientation in MCF-10A metaphase cells was determined as in Godin et al. (2010). Details can be found in [Supplemental Experimental Procedures](#).

Live-Cell Microscopy

Imaging was performed at 37°C in 5% CO_2 using an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon) coupled to a spinning-disk confocal system (CSU-X1; Yokogawa). Exposure times and laser power details can be found in [Supplemental Experimental Procedures](#).

Mouse Strains

Mice were bred in a 129SV/C57BL6 genetic background. *Htt*^{flox/flox} mice were used as controls and *K5Cre;Htt*^{flox/flox} as mutants. All experiments were performed in accordance with the recommendations of the European Community (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) for the care and use of laboratory animals (permissions 91-448 to S.H. and 76-102 to S.E.).

Histological Analysis

Detailed information for whole-mount preparation and Carmine/X-gal staining, mammary gland processing, and immunostaining can be found in [Supplemental Experimental Procedures](#).

Isolation of Mammary Epithelial Cells and Flow Cytometry

Mammary epithelial cells isolated from the inguinal glands of five 12-week-old virgin *K5Cre* mice were pooled and stained with anti-CD24-FITC, anti-CD49F-PE, anti-CD45-APC, and anti-CD31-APC

antibodies (Taddei et al., 2008). CD24-low/CD49F-high (basal) and CD24-high/CD49F-low (luminal) cells were purified using FACSaria III (SORP; Becton Dickinson). CD45- and CD31-positive stromal cells were excluded from the analysis. Conjugated isotype-matching immunoglobulin Gs (IgGs) were used as negative controls. To separate luminal subpopulations, cells were stained with anti-CD49B-APC and anti-SCA1-PE-Cy7 antibodies, and the SCA1⁺/CD49B⁻, SCA1⁺/CD49B⁺, and SCA1⁻/CD49B⁺ were purified (Shehata et al., 2012).

Quantitative RT-PCR

RNA samples were retrotranscribed using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). cDNAs were submitted to RT-PCR with the 7900HT Fast Real-Time PCR System using power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with the oligonucleotide pairs detailed in [Supplemental Experimental Procedures](#). Fold changes were calculated using the ddCT method. Values were normalized to those for *hprt* and β -actin.

Statistical Analyses

GraphPad Prism 6.0 software was used for statistical analysis. Complete statistical analyses with the number of measures are detailed in [Supplemental Experimental Procedures](#).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, six figures, one table, and six movies and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.02.011>.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge F. Saudou for support; I. Cheeseman, Y. Fengwei, M.A. Glukhova, A. Hyman, F. Mechta-Grigoriou, and M. Piel for reagents, mice, and/or discussions; the staff of the Institut Curie imaging, histology, and animal facilities for technical help; and members of the S.H. and Saudou's laboratories for helpful comments. This work was supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares (ANR-09-BLAN-0080 to S.H. and ANR Blanc 2012-LIVESPIN to X.M.), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC subvention libre n°3188 to S.H. and ARC 2011-LIVESPIN to X.M.), Fondation pour la Recherche Médicale (équipe labellisée to S.H.), INSERM Avenir Grant (R08221JS to X.M.), CNRS (to S.H.), INSERM (to S.H.), and Institut Curie (to S.H.). S.H. is an INSERM investigator.

Received: October 7, 2013

Revised: February 27, 2014

Accepted: February 27, 2014

Published: April 3, 2014

REFERENCES

Asselin-Labat, M.L., Vaillant, F., Sheridan, J.M., Pal, B., Wu, D., Simpson, E.R., Yasuda, H., Smyth, G.K., Martin, T.J., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* 465, 798–802.



- Beleut, M., Rajaram, R.D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Germano, D., Choi, Y., Schneider, P., and Briskin, C. (2010). Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 2989–2994.
- Boite, S., and Cordelières, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232.
- Bouras, T., Pal, B., Vaillant, F., Harburg, G., Asselin-Labat, M.L., Oakes, S.R., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2008). Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. *Cell Stem Cell* 3, 429–441.
- Caviston, J.P., Ross, J.L., Antony, S.M., Tokito, M., and Holzbaur, E.L. (2007). Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 10045–10050.
- Cicalese, A., Bonizzi, G., Pasi, C.E., Faretta, M., Ronzoni, S., Giulini, B., Briskin, C., Minucci, S., Di Fiore, P.P., and Pelicci, P.G. (2009). The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* 138, 1083–1095.
- Colin, E., Zala, D., Liot, G., Rangone, H., Borrell-Pagès, M., Li, X.J., Saudou, F., and Humbert, S. (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J.* 27, 2124–2134.
- Coquelle, F.M., Caspi, M., Cordelières, F.P., Dompierre, J.P., Dujardin, D.L., Koifman, C., Martin, P., Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., Galjart, N., et al. (2002). LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3089–3102.
- Cotton, M., Benhra, N., and Le Borgne, R. (2013). Numb inhibits the recycling of Sanpodo in *Drosophila* sensory organ precursor. *Curr. Biol.* 23, 581–587.
- Couturier, L., Mazouni, K., and Schweisguth, F. (2013). Numb localizes at endosomes and controls the endosomal sorting of notch after asymmetric division in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 23, 588–593.
- Dompierre, J.P., Godin, J.D., Charrin, B.C., Cordelières, F.P., King, S.J., Humbert, S., and Saudou, F. (2007). Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J. Neurosci.* 27, 3571–3583.
- Dragatsis, I., Levine, M.S., and Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat. Genet.* 26, 300–306.
- Driessens, G., Beck, B., Caauwe, A., Simons, B.D., and Blanpain, C. (2012). Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature* 488, 527–530.
- Faulkner, N.E., Dujardin, D.L., Tai, C.Y., Vaughan, K.T., O'Connell, C.B., Wang, Y., and Vallee, R.B. (2000). A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat. Cell Biol.* 2, 784–791.
- Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelières, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S., and Saudou, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118, 127–138.
- Gjorevski, N., and Nelson, C.M. (2011). Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 581–593.
- Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.L., Guillemot, F., Dragatsis, I., et al. (2010). Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67, 392–406.
- Grill, S.W., and Hyman, A.A. (2005). Spindle positioning by cortical pulling forces. *Dev. Cell* 8, 461–465.
- Jahchan, N.S., Wang, D., Bissell, M.J., and Luo, K. (2012). SnoN regulates mammary gland alveologenesis and onset of lactation by promoting prolactin/Stat5 signaling. *Development* 139, 3147–3156.
- Joshi, P.A., Jackson, H.W., Beristain, A.G., Di Grappa, M.A., Mote, P.A., Clarke, C.L., Stingl, J., Waterhouse, P.D., and Khokha, R. (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* 465, 803–807.
- Kiyomitsu, T., and Cheeseman, I.M. (2012). Chromosome- and spindle-pole-derived signals generate an intrinsic code for spindle position and orientation. *Nat. Cell Biol.* 14, 311–317.
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., and Matsuzaki, F. (2008). Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* 10, 93–101.
- Kotak, S., Busso, C., and Gönczy, P. (2012). Cortical dynein is critical for proper spindle positioning in human cells. *J. Cell Biol.* 199, 97–110.
- Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2012). Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 737–746.
- Lu, M.S., and Prehoda, K.E. (2013). A NudE/14-3-3 pathway coordinates dynein and the kinesin Khc73 to position the mitotic spindle. *Dev. Cell* 26, 369–380.
- McGuire, J.R., Rong, J., Li, S.H., and Li, X.J. (2006). Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *J. Biol. Chem.* 281, 3552–3559.
- Moreira Sousa, C., McGuire, J.R., Thion, M.S., Gentien, D., de la Grange, P., Tezenas du Montcel, S., Vincent-Salomon, A., Durr, A., and Humbert, S. (2013). The Huntington disease protein accelerates breast tumour development and metastasis through ErbB2/HER2 signalling. *EMBO Mol. Med.* 5, 309–325.
- Morin, X., and Bellaïche, Y. (2011). Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev. Cell* 21, 102–119.
- Morin, X., Jaouen, F., and Durbec, P. (2007). Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nat. Neurosci.* 10, 1440–1448.
- Moumen, M., Chiche, A., Cagnet, S., Petit, V., Raymond, K., Faraldo, M.M., Deugnier, M.A., and Glukhova, M.A. (2011). The mammary myoepithelial cell. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 763–771.
- Pardo, R., Molina-Calavita, M., Poizat, G., Keryer, G., Humbert, S., and Saudou, F. (2010). pARIS-htt: an optimised expression platform to study huntingtin reveals functional domains required for vesicular trafficking. *Mol. Brain* 3, 17.
- Peyre, E., and Morin, X. (2012). An oblique view on the role of spindle orientation in vertebrate neurogenesis. *Dev. Growth Differ.* 54, 287–305.



- Peyre, E., Jaouen, F., Saadaoui, M., Haren, L., Merdes, A., Durbec, P., and Morin, X. (2011). A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. *J. Cell Biol.* 193, 141–154.
- Quyn, A.J., Appleton, P.L., Carey, F.A., Steele, R.J., Barker, N., Clevers, H., Ridgway, R.A., Sansom, O.J., and Näthke, I.S. (2010). Spindle orientation bias in gut epithelial stem cell compartments is lost in precancerous tissue. *Cell Stem Cell* 6, 175–181.
- Ramirez, A., Page, A., Gandarillas, A., Zanet, J., Pibre, S., Vidal, M., Tusell, L., Genesca, A., Whitaker, D.A., Melton, D.W., and Jorcano, J.L. (2004). A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis* 39, 52–57.
- Regan, J.L., Sourisseau, T., Soady, K., Kendrick, H., McCarthy, A., Tang, C., Brennan, K., Linardopoulos, S., White, D.E., and Smalley, M.J. (2013). Aurora A kinase regulates mammary epithelial cell fate by determining mitotic spindle orientation in a Notch-dependent manner. *Cell Rep.* 4, 110–123.
- Rios, A.C., Fu, N.Y., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2014). In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* 506, 322–327.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84–88.
- Shehata, M., Teschendorff, A., Sharp, G., Novcic, N., Russell, A., Avril, S., Prater, M., Eirew, P., Caldas, C., Watson, C.J., and Stingl, J. (2012). Phenotypic and functional characterization of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Res.* 14, R134.
- Shirasaki, D.I., Greiner, E.R., Al-Ramahi, I., Gray, M., Boontheung, P., Geschwind, D.H., Botas, J., Coppola, G., Horvath, S., Loo, J.A., and Yang, X.W. (2012). Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron* 75, 41–57.
- Shitamukai, A., and Matsuzaki, F. (2012). Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors. *Dev. Growth Differ.* 54, 277–286.
- Silberstein, G.B. (2001). Postnatal mammary gland morphogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 52, 155–162.
- Siller, K.H., and Doe, C.Q. (2009). Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* 11, 365–374.
- Taddei, I., Deugnier, M.A., Faraldo, M.M., Petit, V., Bouvard, D., Medina, D., Fässler, R., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2008). Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 716–722.
- Velier, J., Kim, M., Schwarz, C., Kim, T.W., Sapp, E., Chase, K., Aronin, N., and DiFiglia, M. (1998). Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Exp. Neurol.* 152, 34–40.
- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2011). The unmasking of novel unipotent stem cells in the mammary gland. *EMBO J.* 30, 4858–4859.
- Williams, S.E., Beronja, S., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2011). Asymmetric cell divisions promote Notch-dependent epidermal differentiation. *Nature* 470, 353–358.
- Woodard, G.E., Huang, N.N., Cho, H., Miki, T., Tall, G.G., and Kehrl, J.H. (2010). Ric-8A and Gi alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3519–3530.
- Yalcin-Ozuysal, O., Fiche, M., Guitierrez, M., Wagner, K.U., Raf-foul, W., and Briskin, C. (2010). Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. *Cell Death Differ.* 17, 1600–1612.
- Zheng, Z., Zhu, H., Wan, Q., Liu, J., Xiao, Z., Siderovski, D.P., and Du, Q. (2010). LGN regulates mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis. *J. Cell Biol.* 189, 275–288.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72, 971-983.
- (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 350, 1047-1059.
- (1998). ACMG/ASHG statement. Laboratory guidelines for Huntington disease genetic testing. The American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Huntington Disease Genetic Testing Working Group. *American journal of human genetics* 62, 1243-1247.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* 15, 6541-6551.
- Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., *et al.* (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Current biology : CB* 7, 776-789.
- Allinen, M., Beroukhim, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., *et al.* (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer cell* 6, 17-32.
- Altar, C.A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J.M., Acheson, A.L., Lindsay, R.M., and Wiegand, S.J. (1997). Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389, 856-860.
- Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., and Hemmings, B.A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *The Journal of biological chemistry* 272, 31515-31524.
- Andres, A.C., and Strange, R. (1999). Apoptosis in the estrous and menstrual cycles. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 4, 221-228.
- Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M.A., *et al.* (1993a). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature genetics* 4, 398-403.
- Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B.Y., Kalchman, M.A., *et al.* (1993b). The Relationship between Trinucleotide (Cag) Repeat Length and Clinical-Features of Huntingtons-Disease. *Nature Genetics* 4, 398-403.
- Andrews, J., Kennette, W., Pilon, J., Hodgson, A., Tuck, A.B., Chambers, A.F., and Rodenhiser, D.I. (2010). Multi-platform whole-genome microarray analyses refine the epigenetic signature of breast cancer metastasis with gene expression and copy number. *PloS one* 5, e8665.
- Anne, S.L., Saudou, F., and Humbert, S. (2007). Phosphorylation of huntingtin by cyclin-dependent kinase 5 is induced by DNA damage and regulates wild-type and mutant huntingtin toxicity in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 7318-7328.
- Antoniou, A.C., Kartsonaki, C., Sinilnikova, O.M., Soucy, P., McGuffog, L., Healey, S., Lee, A., Peterlongo, P., Manoukian, S., Peissel, B., *et al.* (2011). Common alleles at 6q25.1 and 1p11.2 are

associated with breast cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Human molecular genetics* 20, 3304-3321.

Antoniou, A.C., Sinilnikova, O.M., Simard, J., Leone, M., Dumont, M., Neuhausen, S.L., Struwing, J.P., Stoppa-Lyonnet, D., Barjhoux, L., Hughes, D.J., *et al.* (2007). RAD51 135G-->C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. *Am J Hum Genet* 81, 1186-1200.

Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbinavar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y., and Slamon, D.J. (2003). Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer research* 63, 196-206.

Aslakson, C.J., and Miller, F.R. (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer research* 52, 1399-1405.

Asselin-Labat, M.L., Shackleton, M., Stingl, J., Vaillant, F., Forrest, N.C., Eaves, C.J., Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2006). Steroid hormone receptor status of mouse mammary stem cells. *Journal of the National Cancer Institute* 98, 1011-1014.

Asselin-Labat, M.L., Sutherland, K.D., Barker, H., Thomas, R., Shackleton, M., Forrest, N.C., Hartley, L., Robb, L., Grosveld, F.G., van der Wees, J., *et al.* (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nature cell biology* 9, 201-209.

Asselin-Labat, M.L., Vaillant, F., Sheridan, J.M., Pal, B., Wu, D., Simpson, E.R., Yasuda, H., Smyth, G.K., Martin, T.J., Lindeman, G.J., *et al.* (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* 465, 798-802.

Association of Breast Surgery at, B. (2009). Surgical guidelines for the management of breast cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 35 Suppl 1, 1-22.

Atwood, C.S., Hovey, R.C., Glover, J.P., Chepko, G., Ginsburg, E., Robison, W.G., and Vonderhaar, B.K. (2000). Progesterone induces side-branching of the ductal epithelium in the mammary glands of peripubertal mice. *The Journal of endocrinology* 167, 39-52.

Aylward, E.H., Sparks, B.F., Field, K.M., Yallapragada, V., Shpritz, B.D., Rosenblatt, A., Brandt, J., Gourley, L.M., Liang, K., Zhou, H., *et al.* (2004). Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* 63, 66-72.

Bae, B.I., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., Taya, Y., Hayward, S.D., Moran, T.H., Montell, C., Ross, C.A., *et al.* (2005). p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* 47, 29-41.

Bajaj, A., Driver, J.A., and Schernhammer, E.S. (2010). Parkinson's disease and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer causes & control : CCC* 21, 697-707.

Balda, M.S., Garrett, M.D., and Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *The Journal of cell biology* 160, 423-432.

Balda, M.S., and Matter, K. (2000). The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *The EMBO journal* 19, 2024-2033.

- Balogh, G.A., Heulings, R., Mailo, D.A., Russo, P.A., Sheriff, F., Russo, I.H., Moral, R., and Russo, J. (2006). Genomic signature induced by pregnancy in the human breast. *International journal of oncology* 28, 399-410.
- Baquet, Z.C., Gorski, J.A., and Jones, K.R. (2004). Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 4250-4258.
- Barnes, D.R., Lee, A., Investigators, E., kConFab, I., Easton, D.F., and Antoniou, A.C. (2012). Evaluation of association methods for analysing modifiers of disease risk in carriers of high-risk mutations. *Genet Epidemiol* 36, 274-291.
- Baselga, J., Cortes, J., Kim, S.B., Im, S.A., Hegg, R., Im, Y.H., Roman, L., Pedrini, J.L., Pienkowski, T., Knott, A., *et al.* (2012). Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* 366, 109-119.
- Ben M'Barek, K., Pla, P., Orvoen, S., Benstaali, C., Godin, J.D., Gardier, A.M., Saudou, F., David, D.J., and Humbert, S. (2013). Huntingtin mediates anxiety/depression-related behaviors and hippocampal neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 8608-8620.
- Blamey, R.W., Ellis, I.O., Pinder, S.E., Lee, A.H., Macmillan, R.D., Morgan, D.A., Robertson, J.F., Mitchell, M.J., Ball, G.R., Haybittle, J.L., *et al.* (2007). Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990-1999. *European journal of cancer* 43, 1548-1555.
- Blanco, M.J., Moreno-Bueno, G., Sarrio, D., Locascio, A., Cano, A., Palacios, J., and Nieto, M.A. (2002). Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 21, 3241-3246.
- Blenkiron, C., Goldstein, L.D., Thorne, N.P., Spiteri, I., Chin, S.F., Dunning, M.J., Barbosa-Morais, N.L., Teschendorff, A.E., Green, A.R., Ellis, I.O., *et al.* (2007). MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome biology* 8, R214.
- Bocchinfuso, W.P., Lindzey, J.K., Hewitt, S.C., Clark, J.A., Myers, P.H., Cooper, R., and Korach, K.S. (2000). Induction of mammary gland development in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* 141, 2982-2994.
- Bockhorn, M., Jain, R.K., and Munn, L.L. (2007). Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *The lancet oncology* 8, 444-448.
- Bohl, C.R., Harihar, S., Denning, W.L., Sharma, R., and Welch, D.R. (2014). Metastasis suppressors in breast cancers: mechanistic insights and clinical potential. *Journal of molecular medicine* 92, 13-30.
- Bolander, F.F., Jr. (1990). Differential characteristics of the thoracic and abdominal mammary glands from mice. *Experimental cell research* 189, 142-144.
- Borowsky, A. (2007). Special considerations in mouse models of breast cancer. *Breast disease* 28, 29-38.
- Borrell-Pages, M., Zala, D., Humbert, S., and Saudou, F. (2006). Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 2642-2660.

- Bose, S., Chandran, S., Mirocha, J.M., and Bose, N. (2006). The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 19, 238-245.
- Bouras, T., Pal, B., Vaillant, F., Harburg, G., Asselin-Labat, M.L., Oakes, S.R., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2008). Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. *Cell stem cell* 3, 429-441.
- Briskin, C., and O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a003178.
- Buerger, H., Mommers, E.C., Littmann, R., Simon, R., Diallo, R., Poremba, C., Dockhorn-Dworniczak, B., van Diest, P.J., and Boecker, W. (2001). Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution. *The Journal of pathology* 194, 165-170.
- Buerger, H., Otterbach, F., Simon, R., Schafer, K.L., Poremba, C., Diallo, R., Brinkschmidt, C., Dockhorn-Dworniczak, B., and Boecker, W. (1999). Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *The Journal of pathology* 189, 521-526.
- Buono, K.D., Robinson, G.W., Martin, C., Shi, S., Stanley, P., Tanigaki, K., Honjo, T., and Hennighausen, L. (2006). The canonical Notch/RBP-J signaling pathway controls the balance of cell lineages in mammary epithelium during pregnancy. *Developmental biology* 293, 565-580.
- Burdall, S.E., Hanby, A.M., Lansdown, M.R., and Speirs, V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast cancer research : BCR* 5, 89-95.
- Byrne, C., Schairer, C., Wolfe, J., Parekh, N., Salane, M., Brinton, L.A., Hoover, R., and Haile, R. (1995). Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status. *Journal of the National Cancer Institute* 87, 1622-1629.
- Cailleau, R., Olive, M., and Cruciger, Q.V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro* 14, 911-915.
- Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61-70.
- Cariati, M., Marlow, R., and Dontu, G. (2011). Xenotransplantation of breast cancers. *Methods in molecular biology* 731, 471-482.
- Cascione, L., Gasparini, P., Lovat, F., Carasi, S., Pulvirenti, A., Ferro, A., Alder, H., He, G., Vecchione, A., Croce, C.M., *et al.* (2013). Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. *PloS one* 8, e55910.
- Caviston, J.P., Ross, J.L., Antony, S.M., Tokito, M., and Holzbaur, E.L. (2007). Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10045-10050.
- Chamberlain, N.L., Driver, E.D., and Miesfeld, R.L. (1994). The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic acids research* 22, 3181-3186.
- Cheang, M.C., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S.K., Perou, C.M., and Nielsen, T.O. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-

negative phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 1368-1376.

Chen, S., and Parmigiani, G. (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 1329-1333.

Chenevix-Trench, G., Milne, R.L., Antoniou, A.C., Couch, F.J., Easton, D.F., and Goldgar, D.E. (2007). An international initiative to identify genetic modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2 (CIMBA). *Breast Cancer Res* 9, 104.

Clarke, M., Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, E., Godwin, J., Gray, R., Hicks, C., James, S., *et al.* (2005). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 366, 2087-2106.

Colin, E., Regulier, E., Perrin, V., Durr, A., Brice, A., Aebischer, P., Deglon, N., Humbert, S., and Saudou, F. (2005). Akt is altered in an animal model of Huntington's disease and in patients. *The European journal of neuroscience* 21, 1478-1488.

Colin, E., Zala, D., Liot, G., Rangone, H., Borrell-Pages, M., Li, X.J., Saudou, F., and Humbert, S. (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *The EMBO journal* 27, 2124-2134.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C. (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* 360, 187-195.

Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073-1081.

Couch, F.J., Nathanson, K.L., and Offit, K. (2014). Two Decades After BRCA: Setting Paradigms in Personalized Cancer Care and Prevention. *Science* 343, 1466-1470.

Culver, B.P., Savas, J.N., Park, S.K., Choi, J.H., Zheng, S., Zeitlin, S.O., Yates, J.R., 3rd, and Tanese, N. (2012). Proteomic analysis of wild-type and mutant huntingtin-associated proteins in mouse brains identifies unique interactions and involvement in protein synthesis. *The Journal of biological chemistry* 287, 21599-21614.

Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.F., Turashvili, G., Rueda, O.M., Dunning, M.J., Speed, D., Lynch, A.G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., *et al.* (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486, 346-352.

Daniel, C.W., De Ome, K.B., Young, J.T., Blair, P.B., and Faulkin, L.J., Jr. (1968). The in vivo life span of normal and preneoplastic mouse mammary glands: a serial transplantation study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61, 53-60.

Dankort, D.L., and Muller, W.J. (2000). Signal transduction in mammary tumorigenesis: a transgenic perspective. *Oncogene* 19, 1038-1044.

De Leeuw, W.J., Berx, G., Vos, C.B., Peterse, J.L., Van de Vijver, M.J., Litvinov, S., Van Roy, F., Cornelisse, C.J., and Cleton-Jansen, A.M. (1997). Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. *The Journal of pathology* 183, 404-411.

- De Rooij, K.E., De Koning Gans, P.A., Roos, R.A., Van Ommen, G.J., and Den Dunnen, J.T. (1995). Somatic expansion of the (CAG)_n repeat in Huntington disease brains. *Human genetics* 95, 270-274.
- Dent, R., Hanna, W.M., Trudeau, M., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2009). Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 115, 423-428.
- Deome, K.B., Faulkin, L.J., Jr., Bern, H.A., and Blair, P.B. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer research* 19, 515-520.
- Desmond, C.R., Atwal, R.S., Xia, J., and Truant, R. (2012). Identification of a karyopherin beta1/beta2 proline-tyrosine nuclear localization signal in huntingtin protein. *The Journal of biological chemistry* 287, 39626-39633.
- Deugnier, M.A., Teuliere, J., Faraldo, M.M., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2002). The importance of being a myoepithelial cell. *Breast cancer research : BCR* 4, 224-230.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., Reeves, S.A., *et al.* (1995). Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14, 1075-1081.
- Dillon, R.L., Marcotte, R., Hennessy, B.T., Woodgett, J.R., Mills, G.B., and Muller, W.J. (2009). Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer research* 69, 5057-5064.
- Dobie, K.W., Lee, M., Fantes, J.A., Graham, E., Clark, A.J., Springbett, A., Lathe, R., and McClenaghan, M. (1996). Variegated transgene expression in mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 6659-6664.
- Dragatsis, I., Levine, M.S., and Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nature genetics* 26, 300-306.
- Drife, J.O. (1986). Breast development in puberty. *Annals of the New York Academy of Sciences* 464, 58-65.
- Du, Z., Podsypanina, K., Huang, S., McGrath, A., Toneff, M.J., Bogoslovskaja, E., Zhang, X., Moraes, R.C., Fluck, M., Allred, D.C., *et al.* (2006). Introduction of oncogenes into mammary glands in vivo with an avian retroviral vector initiates and promotes carcinogenesis in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17396-17401.
- Ducker, C.E., Stettler, E.M., French, K.J., Upton, J.J., and Smith, C.D. (2004). Huntingtin interacting protein 14 is an oncogenic human protein: palmitoyl acyltransferase. *Oncogene* 23, 9230-9237.
- Dumay, A., Feugeas, J.P., Wittmer, E., Lehmann-Che, J., Bertheau, P., Espie, M., Plassa, L.F., Cottu, P., Marty, M., Andre, F., *et al.* (2013). Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *International journal of cancer Journal international du cancer* 132, 1227-1231.
- Dupont, P., Besson, M.T., Devaux, J., and Lievens, J.C. (2012). Reducing canonical Wingless/Wnt signaling pathway confers protection against mutant Huntingtin toxicity in *Drosophila*. *Neurobiology of disease* 47, 237-247.

- Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Frontali, M., Folstein, S., Ross, C., Franz, M., Abbott, M., *et al.* (1993). Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nature genetics* 4, 387-392.
- Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., *et al.* (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269, 407-410.
- Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine* 315, 1650-1659.
- Eirew, P., Stingl, J., Raouf, A., Turashvili, G., Aparicio, S., Emerman, J.T., and Eaves, C.J. (2008). A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability. *Nature medicine* 14, 1384-1389.
- Elias, S., Thion, M.S., Yu, H., Sousa, C.M., Lasgi, C., Morin, X., and Humbert, S. (2014). Huntingtin regulates mammary stem cell division and differentiation. *Stem cell reports* 2, 491-506.
- Elston, C.W., and Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 403-410.
- Endogenous, H., Breast Cancer Collaborative, G., Key, T.J., Appleby, P.N., Reeves, G.K., Travis, R.C., Alberg, A.J., Barricarte, A., Berrino, F., Krogh, V., *et al.* (2013). Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *The lancet oncology* 14, 1009-1019.
- Ethier, S.P., Mahacek, M.L., Gullick, W.J., Frank, T.S., and Weber, B.L. (1993). Differential isolation of normal luminal mammary epithelial cells and breast cancer cells from primary and metastatic sites using selective media. *Cancer research* 53, 627-635.
- Evans, S.J., Douglas, I., Rawlins, M.D., Wexler, N.S., Tabrizi, S.J., and Smeeth, L. (2013). Prevalence of adult Huntington's disease in the UK based on diagnoses recorded in general practice records. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 84, 1156-1160.
- Farmer, P., Bonnefoi, H., Anderle, P., Cameron, D., Wirapati, P., Becette, V., Andre, S., Piccart, M., Campone, M., Brain, E., *et al.* (2009). A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nature medicine* 15, 68-74.
- Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., Macgrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D., *et al.* (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 24, 4660-4671.
- Feng, Z., Jin, S., Zupnick, A., Hoh, J., de Stanchina, E., Lowe, S., Prives, C., and Levine, A.J. (2006). p53 tumor suppressor protein regulates the levels of huntingtin gene expression. *Oncogene* 25, 1-7.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer* 127, 2893-2917.
- Fernandez-Valdivia, R., and Lydon, J.P. (2012). From the ranks of mammary progesterone mediators, RANKL takes the spotlight. *Molecular and cellular endocrinology* 357, 91-100.

- Fidler, I.J., and Lieber, S. (1972). Quantitative analysis of the mechanism of glucocorticoid enhancement of experimental metastasis. *Research communications in chemical pathology and pharmacology* 4, 607-613.
- Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A., *et al.* (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nature medicine* 14, 518-527.
- Fisher, E.R., and Hayden, M.R. (2013). Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: Prevalence and population at risk. *Mov Disord* 29, 105-114.
- Fisher, E.R., and Hayden, M.R. (2014). Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: prevalence and population at risk. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 29, 105-114.
- Fleming, J.M., Miller, T.C., Kidacki, M., Ginsburg, E., Stuelten, C.H., Stewart, D.A., Troester, M.A., and Vonderhaar, B.K. (2012). Paracrine interactions between primary human macrophages and human fibroblasts enhance murine mammary gland humanization in vivo. *Breast cancer research : BCR* 14, R97.
- Foroni, C., Broggin, M., Generali, D., and Damia, G. (2012). Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer treatment reviews* 38, 689-697.
- Forster, C., Makela, S., Warri, A., Kietz, S., Becker, D., Hultenby, K., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2002). Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15578-15583.
- Freund, R., Dubensky, T., Bronson, R., Sotnikov, A., Carroll, J., and Benjamin, T. (1992). Polyoma tumorigenesis in mice: evidence for dominant resistance and dominant susceptibility genes of the host. *Virology* 191, 724-731.
- Frisch, S.M., and Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology* 124, 619-626.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., and Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1827-1831.
- Gafni, J., and Ellerby, L.M. (2002). Calpain activation in Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 4842-4849.
- Gafni, J., Hermel, E., Young, J.E., Wellington, C.L., Hayden, M.R., and Ellerby, L.M. (2004). Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *The Journal of biological chemistry* 279, 20211-20220.
- Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelieres, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S., *et al.* (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118, 127-138.

- Gervais, F.G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Metzler, M., Hackam, A.S., Tam, J., Vaillancourt, J.P., Houtzager, V., *et al.* (2002). Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hip1. *Nature cell biology* 4, 95-105.
- Geyer, C.E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C.G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., *et al.* (2006). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine* 355, 2733-2743.
- Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological reviews* 81, 629-683.
- Gines, S., Ivanova, E., Seong, I.S., Saura, C.A., and MacDonald, M.E. (2003). Enhanced Akt signaling is an early pro-survival response that reflects N-methyl-D-aspartate receptor activation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 50514-50522.
- Glottfelty, L.A., Zahs, A., Iancu, C., Shen, L., and Hecht, G.A. (2014). Microtubules Are Required for Efficient Epithelial Tight Junction Homeostasis and Restoration. *American journal of physiology Cell physiology*.
- Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.L., Guillemot, F., Dragatsis, I., *et al.* (2010a). Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67, 392-406.
- Godin, J.D., and Humbert, S. (2011). Mitotic spindle: focus on the function of huntingtin. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43, 852-856.
- Godin, J.D., Poizat, G., Hickey, M.A., Maschat, F., and Humbert, S. (2010b). Mutant huntingtin-impaired degradation of beta-catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease. *The EMBO journal* 29, 2433-2445.
- Goehler, H., Lalowski, M., Stelzl, U., Waelter, S., Stroedicke, M., Worm, U., Droege, A., Lindenberg, K.S., Knoblich, M., Haenig, C., *et al.* (2004). A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Molecular cell* 15, 853-865.
- Goffredo, D., Rigamonti, D., Tartari, M., De Micheli, A., Verderio, C., Matteoli, M., Zuccato, C., and Cattaneo, E. (2002). Calcium-dependent cleavage of endogenous wild-type huntingtin in primary cortical neurons. *The Journal of biological chemistry* 277, 39594-39598.
- Goldberg, Y.P., Kremer, B., Andrew, S.E., Theilmann, J., Graham, R.K., Squitieri, F., Telenius, H., Adam, S., Sajoo, A., Starr, E., *et al.* (1993). Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. *Nature genetics* 5, 174-179.
- Gonzalez, K.D., Noltner, K.A., Buzin, C.H., Gu, D., Wen-Fong, C.Y., Nguyen, V.Q., Han, J.H., Lowstuter, K., Longmate, J., Sommer, S.S., *et al.* (2009). Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 1250-1256.
- Graham, R.K., Deng, Y., Slow, E.J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., *et al.* (2006). Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125, 1179-1191.
- Groen, J.L., de Bie, R.M., Foncke, E.M., Roos, R.A., Leenders, K.L., and Tijssen, M.A. (2010). Late-onset Huntington disease with intermediate CAG repeats: true or false? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 81, 228-230.

- Group, T.H.s.D.C.R. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72, 971-983.
- Gruel, N., Lucchesi, C., Raynal, V., Rodrigues, M.J., Pierron, G., Goudefroye, R., Cottu, P., Rey, F., Sastre-Garau, X., Fourquet, A., *et al.* (2010). Lobular invasive carcinoma of the breast is a molecular entity distinct from luminal invasive ductal carcinoma. *European journal of cancer* 46, 2399-2407.
- Gunawardena, S., Her, L.S., Brusch, R.G., Laymon, R.A., Niesman, I.R., Gordesky-Gold, B., Sintasath, L., Bonini, N.M., and Goldstein, L.S. (2003). Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* 40, 25-40.
- Guo, W., Keckesova, Z., Donaher, J.L., Shibue, T., Tischler, V., Reinhardt, F., Itzkovitz, S., Noske, A., Zurrer-Hardi, U., Bell, G., *et al.* (2012). Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* 148, 1015-1028.
- Gusella, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M., Naylor, S.L., Anderson, M.A., Tanzi, R.E., Watkins, P.C., Ottina, K., Wallace, M.R., Sakaguchi, A.Y., *et al.* (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306, 234-238.
- Gutekunst, C.A., Levey, A.I., Heilman, C.J., Whaley, W.L., Yi, H., Nash, N.R., Rees, H.D., Madden, J.J., and Hersch, S.M. (1995). Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8710-8714.
- Guy, C.T., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (1992). Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Molecular and cellular biology* 12, 954-961.
- Ha, A.D., and Jankovic, J. (2011). Exploring the correlates of intermediate CAG repeats in Huntington disease. *Postgraduate medicine* 123, 116-121.
- Hammond, M.E., Hayes, D.F., Dowsett, M., Allred, D.C., Hagerty, K.L., Badve, S., Fitzgibbons, P.L., Francis, G., Goldstein, N.S., Hayes, M., *et al.* (2010). American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, 2784-2795.
- Hannemann, J., Velds, A., Halfwerk, J.B., Kreike, B., Peterse, J.L., and van de Vijver, M.J. (2006). Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling. *Breast cancer research : BCR* 8, R61.
- Harquail, J., Benzina, S., and Robichaud, G.A. (2012). MicroRNAs and breast cancer malignancy: an overview of miRNA-regulated cancer processes leading to metastasis. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 11, 269-280.
- Hartmann, L.C., Sellers, T.A., Frost, M.H., Lingle, W.L., Degnim, A.C., Ghosh, K., Vierkant, R.A., Maloney, S.D., Pankratz, V.S., Hillman, D.W., *et al.* (2005). Benign breast disease and the risk of breast cancer. *The New England journal of medicine* 353, 229-237.
- Hassiotou, F., and Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical anatomy* 26, 29-48.
- Haybittle, J.L., Blamey, R.W., Elston, C.W., Johnson, J., Doyle, P.J., Campbell, F.C., Nicholson, R.I., and Griffiths, K. (1982). A prognostic index in primary breast cancer. *British journal of cancer* 45, 361-366.

- Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., and Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* 4, 988-1004.
- Henrard, D., and Ross, S.R. (1988). Endogenous mouse mammary tumor virus is expressed in several organs in addition to the lactating mammary gland. *Journal of virology* 62, 3046-3049.
- Hermel, E., Gafni, J., Propp, S.S., Leavitt, B.R., Wellington, C.L., Young, J.E., Hackam, A.S., Logvinova, A.V., Peel, A.L., Chen, S.F., *et al.* (2004). Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell death and differentiation* 11, 424-438.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., *et al.* (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology* 8, R76.
- Hoffner, G., Kahlem, P., and Djian, P. (2002). Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease. *Journal of cell science* 115, 941-948.
- Hollestelle, A., Nagel, J.H., Smid, M., Lam, S., Elstrodt, F., Wasielewski, M., Ng, S.S., French, P.J., Peeters, J.K., Rozendaal, M.J., *et al.* (2010). Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast cancer research and treatment* 121, 53-64.
- Holliday, D.L., and Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research : BCR* 13, 215.
- Hoover, K.B., Liao, S.Y., and Bryant, P.J. (1998). Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *The American journal of pathology* 153, 1767-1773.
- Hoshino, K., and Gardner, W.U. (1967). Transplantability and life span of mammary gland during serial transplantation in mice. *Nature* 213, 193-194.
- Hu, M., Yao, J., Carroll, D.K., Weremowicz, S., Chen, H., Carrasco, D., Richardson, A., Violette, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., *et al.* (2008). Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer cell* 13, 394-406.
- Humbert, S., Bryson, E.A., Cordelieres, F.P., Connors, N.C., Datta, S.R., Finkbeiner, S., Greenberg, M.E., and Saudou, F. (2002). The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Developmental cell* 2, 831-837.
- Hutchinson, J.N., Jin, J., Cardiff, R.D., Woodgett, J.R., and Muller, W.J. (2004). Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer research* 64, 3171-3178.
- Hwang, E.S., DeVries, S., Chew, K.L., Moore, D.H., 2nd, Kerlikowske, K., Thor, A., Ljung, B.M., and Waldman, F.M. (2004). Patterns of chromosomal alterations in breast ductal carcinoma in situ. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 5160-5167.
- Irie, H.Y., Pearline, R.V., Grueneberg, D., Hsia, M., Ravichandran, P., Kothari, N., Natesan, S., and Brugge, J.S. (2005). Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology* 171, 1023-1034.
- Jasin, M. (2002). Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene* 21, 8981-8993.

- Jeong, H., Then, F., Melia, T.J., Jr., Mazzulli, J.R., Cui, L., Savas, J.N., Voisine, C., Paganetti, P., Tanese, N., Hart, A.C., *et al.* (2009). Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. *Cell* **137**, 60-72.
- Ji, J., Sundquist, K., and Sundquist, J. (2012). Cancer incidence in patients with polyglutamine diseases: a population-based study in Sweden. *The lancet oncology* **13**, 642-648.
- Joshi, P.A., Jackson, H.W., Beristain, A.G., Di Grappa, M.A., Mote, P.A., Clarke, C.L., Stingl, J., Waterhouse, P.D., and Khokha, R. (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* **465**, 803-807.
- Kadouri, L., Kote-Jarai, Z., Easton, D.F., Hubert, A., Hamoudi, R., Glaser, B., Abeliovich, D., Peretz, T., and Eeles, R.A. (2004). Polyglutamine repeat length in the A1B1 gene modifies breast cancer susceptibility in BRCA1 carriers. *International journal of cancer Journal international du cancer* **108**, 399-403.
- Kalchman, M.A., Graham, R.K., Xia, G., Koide, H.B., Hodgson, J.G., Graham, K.C., Goldberg, Y.P., Gietz, R.D., Pickart, C.M., and Hayden, M.R. (1996). Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *The Journal of biological chemistry* **271**, 19385-19394.
- Kalchman, M.A., Koide, H.B., McCutcheon, K., Graham, R.K., Nichol, K., Nishiyama, K., Kazemi-Esfarjani, P., Lynn, F.C., Wellington, C., Metzler, M., *et al.* (1997). HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nature genetics* **16**, 44-53.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer* **6**, 392-401.
- Kaltenbach, L.S., Romero, E., Becklin, R.R., Chettier, R., Bell, R., Phansalkar, A., Strand, A., Torcassi, C., Savage, J., Hurlburt, A., *et al.* (2007). Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS genetics* **3**, e82.
- Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Cordon-Cardo, C., Guise, T.A., and Massague, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer cell* **3**, 537-549.
- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y.L., Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K.A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A.F., *et al.* (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PloS one* **4**, e6146.
- Kean, S. (2014). The 'other' breast cancer genes. *Science* **343**, 1457-1459.
- Kegel, K.B., Meloni, A.R., Yi, Y., Kim, Y.J., Doyle, E., Cuiffo, B.G., Sapp, E., Wang, Y., Qin, Z.H., Chen, J.D., *et al.* (2002). Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *The Journal of biological chemistry* **277**, 7466-7476.
- Kegel, K.B., Sapp, E., Yoder, J., Cuiffo, B., Sobin, L., Kim, Y.J., Qin, Z.H., Hayden, M.R., Aronin, N., Scott, D.L., *et al.* (2005). Huntingtin associates with acidic phospholipids at the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* **280**, 36464-36473.
- Kelsey, J.L., Gammon, M.D., and John, E.M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiologic reviews* **15**, 36-47.

- Kenney, N.J., Smith, G.H., Lawrence, E., Barrett, J.C., and Salomon, D.S. (2001). Identification of Stem Cell Units in the Terminal End Bud and Duct of the Mouse Mammary Gland. *Journal of biomedicine & biotechnology* 1, 133-143.
- Keryer, G., Pineda, J.R., Liot, G., Kim, J., Dietrich, P., Benstaali, C., Smith, K., Cordelieres, F.P., Spassky, N., Ferrante, R.J., *et al.* (2011). Ciliogenesis is regulated by a huntingtin-HAP1-PCM1 pathway and is altered in Huntington disease. *The Journal of clinical investigation* 121, 4372-4382.
- Killoran, A., Biglan, K.M., Jankovic, J., Eberly, S., Kayson, E., Oakes, D., Young, A.B., and Shoulson, I. (2013). Characterization of the Huntington intermediate CAG repeat expansion phenotype in PHAROS. *Neurology* 80, 2022-2027.
- Kim, W., Kim, M., and Jho, E.H. (2013). Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *The Biochemical journal* 450, 9-21.
- Kim, Y.J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cuiffo, B., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2001). Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12784-12789.
- Ko, J.A., Murata, S., and Nishida, T. (2009). Up-regulation of the tight-junction protein ZO-1 by substance P and IGF-1 in A431 cells. *Cell biochemistry and function* 27, 388-394.
- Kobayashi, T., and Cohen, P. (1999). Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *The Biochemical journal* 339 (Pt 2), 319-328.
- Kumar, R., Atamna, H., Zakharov, M.N., Bhasin, S., Khan, S.H., and Jasuja, R. (2011). Role of the androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer, and spinal and bulbar muscular atrophy. *Life sciences* 88, 565-571.
- La Vecchia, C., Giordano, S.H., Hortobagyi, G.N., and Chabner, B. (2011). Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. *The oncologist* 16, 726-729.
- Lacey, J.V., Jr., Kreimer, A.R., Buys, S.S., Marcus, P.M., Chang, S.C., Leitzmann, M.F., Hoover, R.N., Prorok, P.C., Berg, C.D., Hartge, P., *et al.* (2009). Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC cancer* 9, 84.
- Lafkas, D., Rodilla, V., Huyghe, M., Mourao, L., Kiaris, H., and Fre, S. (2013). Notch3 marks clonogenic mammary luminal progenitor cells in vivo. *The Journal of cell biology* 203, 47-56.
- Lam, S.W., Jimenez, C.R., and Boven, E. (2014). Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. *Cancer treatment reviews* 40, 129-138.
- Landemaine, T., Jackson, A., Bellahcene, A., Rucci, N., Sin, S., Abad, B.M., Sierra, A., Boudinet, A., Guinebretiere, J.M., Ricevuto, E., *et al.* (2008). A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis. *Cancer research* 68, 6092-6099.
- Lasfargues, E.Y., and Ozzello, L. (1958). Cultivation of human breast carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 21, 1131-1147.

- Lee, J.M., Ramos, E.M., Lee, J.H., Gillis, T., Mysore, J.S., Hayden, M.R., Warby, S.C., Morrison, P., Nance, M., Ross, C.A., *et al.* (2012a). CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology* 78, 690-695.
- Lee, J.M., Ramos, E.M., Lee, J.H., Gillis, T., Mysore, J.S., Hayden, M.R., Warby, S.C., Morrison, P., Nance, M., Ross, C.A., *et al.* (2012b). CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology* 78, 690-695.
- Lee, U., Frankenberger, C., Yun, J., Bevilacqua, E., Caldas, C., Chin, S.F., Rueda, O.M., Reinitz, J., and Rosner, M.R. (2013). A prognostic gene signature for metastasis-free survival of triple negative breast cancer patients. *PloS one* 8, e82125.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., *et al.* (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947.
- Li, S.H., Gutekunst, C.A., Hersch, S.M., and Li, X.J. (1998). Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 1261-1269.
- Li, S.H., Schilling, G., Young, W.S., 3rd, Li, X.J., Margolis, R.L., Stine, O.C., Wagster, M.V., Abbott, M.H., Franz, M.L., Ranen, N.G., *et al.* (1993). Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 11, 985-993.
- Li, W., Serpell, L.C., Carter, W.J., Rubinsztein, D.C., and Huntington, J.A. (2006). Expression and characterization of full-length human huntingtin, an elongated HEAT repeat protein. *The Journal of biological chemistry* 281, 15916-15922.
- Li, X., Sapp, E., Valencia, A., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Alexander, J., Masso, N., Reeves, P., Ritch, J.J., Zeitlin, S., *et al.* (2008). A function of huntingtin in guanine nucleotide exchange on Rab11. *Neuroreport* 19, 1643-1647.
- Li, X.J., Li, S.H., Sharp, A.H., Nucifora, F.C., Jr., Schilling, G., Lanahan, A., Worley, P., Snyder, S.H., and Ross, C.A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378, 398-402.
- Lifsted, T., Le Voyer, T., Williams, M., Muller, W., Klein-Szanto, A., Buetow, K.H., and Hunter, K.W. (1998). Identification of inbred mouse strains harboring genetic modifiers of mammary tumor age of onset and metastatic progression. *International journal of cancer Journal international du cancer* 77, 640-644.
- Lim, E., Modi, K.D., and Kim, J. (2009a). In vivo bioluminescent imaging of mammary tumors using IVIS spectrum. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N.C., Pal, B., Hart, A.H., Asselin-Labat, M.L., Gyorki, D.E., Ward, T., Partanen, A., *et al.* (2009b). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature medicine* 15, 907-913.
- Lin, E.Y., Jones, J.G., Li, P., Zhu, L., Whitney, K.D., Muller, W.J., and Pollard, J.W. (2003). Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *The American journal of pathology* 163, 2113-2126.
- Linos, E., Willett, W.C., Cho, E., and Frazier, L. (2010). Adolescent diet in relation to breast cancer risk among premenopausal women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the*

American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 19, 689-696.

Liot, G., Zala, D., Pla, P., Mottet, G., Piel, M., and Saudou, F. (2013). Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 6298-6309.

Liu, R., Gao, X., Lu, Y., and Chen, H. (2011). Meta-analysis of the relationship between Parkinson disease and melanoma. *Neurology* 76, 2002-2009.

Lo Sardo, V., Zuccato, C., Gaudenzi, G., Vitali, B., Ramos, C., Tartari, M., Myre, M.A., Walker, J.A., Pistocchi, A., Conti, L., *et al.* (2012). An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin. *Nature neuroscience* 15, 713-721.

London, S.J., Connolly, J.L., Schnitt, S.J., and Colditz, G.A. (1992). A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 267, 941-944.

Luo, Y., Zhou, H., Krueger, J., Kaplan, C., Lee, S.H., Dolman, C., Markowitz, D., Wu, W., Liu, C., Reisfeld, R.A., *et al.* (2006). Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *The Journal of clinical investigation* 116, 2132-2141.

Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *The American journal of pathology* 153, 865-873.

Ma, L.L., Yu, J.T., Wang, H.F., Meng, X.F., Tan, C.C., Wang, C., and Tan, L. (2014). Association between Cancer and Alzheimer's Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*.

Ma, X.J., Dahiya, S., Richardson, E., Erlander, M., and Sgroi, D.C. (2009). Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast cancer research : BCR* 11, R7.

Ma, X.J., Salunga, R., Tuggle, J.T., Gaudet, J., Enright, E., McQuary, P., Payette, T., Pistone, M., Stecker, K., Zhang, B.M., *et al.* (2003). Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5974-5979.

Maat-Kievit, A., Losekoot, M., Van Den Boer-Van Den Berg, H., Van Ommen, G.J., Niermeijer, M., Breuning, M., and Tibben, A. (2001). New problems in testing for Huntington's disease: the issue of intermediate and reduced penetrance alleles. *Journal of medical genetics* 38, E12.

Macias, H., and Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* 1, 533-557.

Maffini, M.V., Calabro, J.M., Soto, A.M., and Sonnenschein, C. (2005). Stromal regulation of neoplastic development: age-dependent normalization of neoplastic mammary cells by mammary stroma. *The American journal of pathology* 167, 1405-1410.

Maffini, M.V., Soto, A.M., Calabro, J.M., Ucci, A.A., and Sonnenschein, C. (2004). The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *Journal of cell science* 117, 1495-1502.

Maller, O., Martinson, H., and Schedin, P. (2010). Extracellular matrix composition reveals complex and dynamic stromal-epithelial interactions in the mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 15, 301-318.

- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Mahal, A., Mott, R., Seller, M., and Bates, G.P. (1997). Instability of highly expanded CAG repeats in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Nature genetics* 15, 197-200.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W., *et al.* (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493-506.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., *et al.* (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.
- Manie, E., Vincent-Salomon, A., Lehmann-Che, J., Pierron, G., Turpin, E., Warcoin, M., Gruel, N., Lebigot, I., Sastre-Garau, X., Lidereau, R., *et al.* (2009). High frequency of TP53 mutation in BRCA1 and sporadic basal-like carcinomas but not in BRCA1 luminal breast tumors. *Cancer research* 69, 663-671.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Marcotte, R., and Muller, W.J. (2008). Signal transduction in transgenic mouse models of human breast cancer--implications for human breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 13, 323-335.
- Maroulakou, I.G., Oemler, W., Naber, S.P., and Tschlis, P.N. (2007). Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer research* 67, 167-177.
- Martin, T.A., Watkins, G., Mansel, R.E., and Jiang, W.G. (2004). Loss of tight junction plaque molecules in breast cancer tissues is associated with a poor prognosis in patients with breast cancer. *European journal of cancer* 40, 2717-2725.
- Maskarinec, G., and Noh, J.J. (2004). The effect of migration on cancer incidence among Japanese in Hawaii. *Ethnicity & disease* 14, 431-439.
- Mather, I.H., and Keenan, T.W. (1998). The cell biology of milk secretion: historical notes. Introduction. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 3, 227-232.
- Mauro, L., Bartucci, M., Morelli, C., Ando, S., and Surmacz, E. (2001). IGF-I receptor-induced cell-cell adhesion of MCF-7 breast cancer cells requires the expression of junction protein ZO-1. *The Journal of biological chemistry* 276, 39892-39897.
- McGuire, J.R., Rong, J., Li, S.H., and Li, X.J. (2006). Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *The Journal of biological chemistry* 281, 3552-3559.
- McNeil, S.M., Novelletto, A., Srinidhi, J., Barnes, G., Kornbluth, I., Altherr, M.R., Wasmuth, J.J., Gusella, J.F., MacDonald, M.E., and Myers, R.H. (1997). Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation. *Human molecular genetics* 6, 775-779.
- Melchor, L., and Benitez, J. (2013). The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Human genetics* 132, 845-863.

- Melone, M.A., Calarco, A., Petillo, O., Margarucci, S., Colucci-D'Amato, L., Galderisi, U., Koverech, G., and Peluso, G. (2013). Mutant huntingtin regulates EGF receptor fate in non-neuronal cells lacking wild-type protein. *Biochimica et biophysica acta* 1832, 105-113.
- Mende-Mueller, L.M., Toneff, T., Hwang, S.R., Chesselet, M.F., and Hook, V.Y. (2001). Tissue-specific proteolysis of Huntingtin (htt) in human brain: evidence of enhanced levels of N- and C-terminal htt fragments in Huntington's disease striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 1830-1837.
- Metzler, M., Gan, L., Mazarei, G., Graham, R.K., Liu, L., Bissada, N., Lu, G., Leavitt, B.R., and Hayden, M.R. (2010). Phosphorylation of huntingtin at Ser421 in YAC128 neurons is associated with protection of YAC128 neurons from NMDA-mediated excitotoxicity and is modulated by PP1 and PP2A. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 14318-14329.
- Metzler, M., Helgason, C.D., Dragatsis, I., Zhang, T., Gan, L., Pineault, N., Zeitlin, S.O., Humphries, R.K., and Hayden, M.R. (2000). Huntingtin is required for normal hematopoiesis. *Human molecular genetics* 9, 387-394.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W., *et al.* (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.
- Mikosz, C.A., Brickley, D.R., Sharkey, M.S., Moran, T.W., and Conzen, S.D. (2001). Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, sgk-1. *The Journal of biological chemistry* 276, 16649-16654.
- Miles, F.L., Pruitt, F.L., van Golen, K.L., and Cooper, C.R. (2008). Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clinical & experimental metastasis* 25, 305-324.
- Miller, F.R., Miller, B.E., and Heppner, G.H. (1983). Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion & metastasis* 3, 22-31.
- Miller, J.P., Holcomb, J., Al-Ramahi, I., de Haro, M., Gafni, J., Zhang, N., Kim, E., Sanhueza, M., Torcassi, C., Kwak, S., *et al.* (2010). Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron* 67, 199-212.
- Miron, A., Varadi, M., Carrasco, D., Li, H., Luongo, L., Kim, H.J., Park, S.Y., Cho, E.Y., Lewis, G., Kehoe, S., *et al.* (2010). PIK3CA mutations in in situ and invasive breast carcinomas. *Cancer research* 70, 5674-5678.
- Mironchik, Y., Winnard, P.T., Jr., Vesuna, F., Kato, Y., Wildes, F., Pathak, A.P., Kominsky, S., Artemov, D., Bhujwala, Z., Van Diest, P., *et al.* (2005). Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer research* 65, 10801-10809.
- Molina-Calavita, M., Barnat, M., Elias, S., Aparicio, E., Piel, M., and Humbert, S. (2014). Mutant huntingtin affects cortical progenitor cell division and development of the mouse neocortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 10034-10040.
- Moreira Sousa, C., and Humbert, S. (2013). Huntingtin: here, there, everywhere! *Journal of Huntington's disease* 2, 395-403.
- Moreira Sousa, C., McGuire, J.R., Thion, M.S., Gentien, D., de la Grange, P., Tezenas du Montcel, S., Vincent-Salomon, A., Durr, A., and Humbert, S. (2013). The Huntington disease protein accelerates

breast tumour development and metastasis through ErbB2/HER2 signalling. *EMBO molecular medicine* 5, 309-325.

Morrison, P.J., Harding-Lester, S., and Bradley, A. (2011). Uptake of Huntington disease predictive testing in a complete population. *Clinical genetics* 80, 281-286.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.

Muschler, J., and Streuli, C.H. (2010). Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a003202.

Myers, R.H., MacDonald, M.E., Koroshetz, W.J., Duyao, M.P., Ambrose, C.M., Taylor, S.A., Barnes, G., Srinidhi, J., Lin, C.S., Whaley, W.L., *et al.* (1993). De novo expansion of a (CAG)_n repeat in sporadic Huntington's disease. *Nature genetics* 5, 168-173.

Nance, M.A., Mathias-Hagen, V., Breningstall, G., Wick, M.J., and McGlennen, R.C. (1999). Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease. *Neurology* 52, 392-394.

Narod, S.A., and Foulkes, W.D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature reviews Cancer* 4, 665-676.

Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., and Hayden, M.R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81, 811-823.

Nassour, M., Idoux-Gillet, Y., Selmi, A., Come, C., Faraldo, M.L., Deugnier, M.A., and Savagner, P. (2012). Slug controls stem/progenitor cell growth dynamics during mammary gland morphogenesis. *PloS one* 7, e53498.

Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F., *et al.* (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell* 10, 515-527.

Newcomb, P.A., Storer, B.E., Longnecker, M.P., Mittendorf, R., Greenberg, E.R., Clapp, R.W., Burke, K.P., Willett, W.C., and MacMahon, B. (1994). Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *The New England journal of medicine* 330, 81-87.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.

Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335-348.

Pardo, R., Colin, E., Regulier, E., Aebischer, P., Deglon, N., Humbert, S., and Saudou, F. (2006). Inhibition of calcineurin by FK506 protects against polyglutamine-huntingtin toxicity through an increase of huntingtin phosphorylation at S421. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 1635-1645.

Pearson, C.E., Nichol Edamura, K., and Cleary, J.D. (2005). Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nature reviews Genetics* 6, 729-742.

- Pece, S., Tosoni, D., Confalonieri, S., Mazzarol, G., Vecchi, M., Ronzoni, S., Bernard, L., Viale, G., Pelicci, P.G., and Di Fiore, P.P. (2010). Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* **140**, 62-73.
- Perlis, R.H., Smoller, J.W., Mysore, J., Sun, M., Gillis, T., Purcell, S., Rietschel, M., Nothen, M.M., Witt, S., Maier, W., *et al.* (2010). Prevalence of incompletely penetrant Huntington's disease alleles among individuals with major depressive disorder. *The American journal of psychiatry* **167**, 574-579.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752.
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., and Olivier, M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation* **28**, 622-629.
- Peyre, E., Jaouen, F., Saadaoui, M., Haren, L., Merdes, A., Durbec, P., and Morin, X. (2011). A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. *The Journal of cell biology* **193**, 141-154.
- Pharoah, P.D., Guilford, P., Caldas, C., and International Gastric Cancer Linkage, C. (2001). Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* **121**, 1348-1353.
- Pike, M.C., Krailo, M.D., Henderson, B.E., Casagrande, J.T., and Hoel, D.G. (1983). 'Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer. *Nature* **303**, 767-770.
- Pineda, J.R., Pardo, R., Zala, D., Yu, H., Humbert, S., and Saudou, F. (2009). Genetic and pharmacological inhibition of calcineurin corrects the BDNF transport defect in Huntington's disease. *Molecular brain* **2**, 33.
- Pla, P., Orvoen, S., Saudou, F., David, D.J., and Humbert, S. (2014). Mood disorders in Huntington's disease: from behavior to cellular and molecular mechanisms. *Front Behav Neurosci* **8**, 135.
- Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer* **4**, 71-78.
- Porter, D., and Polyak, K. (2003). Cancer target discovery using SAGE. *Expert opinion on therapeutic targets* **7**, 759-769.
- Prat, A., Cheang, M.C., Martin, M., Parker, J.S., Carrasco, E., Caballero, R., Tyldesley, S., Gelmon, K., Bernard, P.S., Nielsen, T.O., *et al.* (2013). Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, 203-209.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* **12**, R68.
- Prat, A., and Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology* **5**, 5-23.
- Preobrazhenska, O., Yakymovych, M., Kanamoto, T., Yakymovych, I., Stoika, R., Heldin, C.H., and Souchelnytskyi, S. (2002). BRCA2 and Smad3 synergize in regulation of gene transcription. *Oncogene* **21**, 5660-5664.

- Rakha, E.A., El-Sayed, M.E., Lee, A.H., Elston, C.W., Grainge, M.J., Hodi, Z., Blamey, R.W., and Ellis, I.O. (2008). Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 3153-3158.
- Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S., Baehner, F., Dabbs, D.J., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S.B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S.R., *et al.* (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast cancer research : BCR* **12**, 207.
- Rakha, E.A., Tan, D.S., Foulkes, W.D., Ellis, I.O., Tutt, A., Nielsen, T.O., and Reis-Filho, J.S. (2007). Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast cancer research : BCR* **9**, 404; author reply 405.
- Rangone, H., Poizat, G., Troncoso, J., Ross, C.A., MacDonald, M.E., Saudou, F., and Humbert, S. (2004). The serum- and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin. *The European journal of neuroscience* **19**, 273-279.
- Rao, D.S., Hyun, T.S., Kumar, P.D., Mizukami, I.F., Rubin, M.A., Lucas, P.C., Sanda, M.G., and Ross, T.S. (2002). Huntingtin-interacting protein 1 is overexpressed in prostate and colon cancer and is critical for cellular survival. *The Journal of clinical investigation* **110**, 351-360.
- Rao, T., Ranger, J.J., Smith, H.W., Lam, S.H., Chodosh, L., and Muller, W.J. (2014). Inducible and coupled expression of the polyomavirus middle T antigen and Cre recombinase in transgenic mice: an in vivo model for synthetic viability in mammary tumour progression. *Breast cancer research : BCR* **16**, R11.
- Raouf, A., Zhao, Y., To, K., Stingl, J., Delaney, A., Barbara, M., Iscove, N., Jones, S., McKinney, S., Emerman, J., *et al.* (2008). Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process. *Cell stem cell* **3**, 109-118.
- Rebbeck, T.R., Mitra, N., Domchek, S.M., Wan, F., Friebel, T.M., Tran, T.V., Singer, C.F., Tea, M.K., Blum, J.L., Tung, N., *et al.* (2011). Modification of BRCA1-Associated Breast and Ovarian Cancer Risk by BRCA1-Interacting Genes. *Cancer research* **71**, 5792-5805.
- Regan, J.L., Kendrick, H., Magnay, F.A., Vafaizadeh, V., Groner, B., and Smalley, M.J. (2012). c-Kit is required for growth and survival of the cells of origin of Brca1-mutation-associated breast cancer. *Oncogene* **31**, 869-883.
- Reis, S.A., Thompson, M.N., Lee, J.M., Fossale, E., Kim, H.H., Liao, J.K., Moskowitz, M.A., Shaw, S.Y., Dong, L., Haggarty, S.J., *et al.* (2011). Striatal neurons expressing full-length mutant huntingtin exhibit decreased N-cadherin and altered neuritogenesis. *Human molecular genetics* **20**, 2344-2355.
- Richert, M.M., Schwertfeger, K.L., Ryder, J.W., and Anderson, S.M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **5**, 227-241.
- Rigamonti, D., Bauer, J.H., De-Fraja, C., Conti, L., Sipione, S., Sciorati, C., Clementi, E., Hackam, A., Hayden, M.R., Li, Y., *et al.* (2000). Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 3705-3713.
- Rios, A.C., Fu, N.Y., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2014). In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* **506**, 322-327.
- Robinson, G.W. (2007). Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development. *Nature reviews Genetics* **8**, 963-972.

- Robinson, G.W., McKnight, R.A., Smith, G.H., and Hennighausen, L. (1995). Mammary epithelial cells undergo secretory differentiation in cycling virgins but require pregnancy for the establishment of terminal differentiation. *Development* 121, 2079-2090.
- Rosenblatt, A., Liang, K.Y., Zhou, H., Abbott, M.H., Gourley, L.M., Margolis, R.L., Brandt, J., and Ross, C.A. (2006). The association of CAG repeat length with clinical progression in Huntington disease. *Neurology* 66, 1016-1020.
- Ross, C.A., and Tabrizi, S.J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet neurology* 10, 83-98.
- Roylance, R., Gorman, P., Harris, W., Liebmann, R., Barnes, D., Hanby, A., and Sheer, D. (1999). Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer research* 59, 1433-1436.
- Rubinsztein, D.C., Leggo, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J.J., Chotai, K., Connarty, M., Crauford, D., Curtis, A., *et al.* (1996). Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *American journal of human genetics* 59, 16-22.
- Sahoo, S., Brickley, D.R., Kocherginsky, M., and Conzen, S.D. (2005). Coordinate expression of the PI3-kinase downstream effectors serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK-1) and Akt-1 in human breast cancer. *European journal of cancer* 41, 2754-2759.
- Sarrio, D., Rodriguez-Pinilla, S.M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., and Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer research* 68, 989-997.
- Sasco, A.J., Lowenfels, A.B., and Pasker-de Jong, P. (1993). Review article: epidemiology of male breast cancer. A meta-analysis of published case-control studies and discussion of selected aetiological factors. *International journal of cancer Journal international du cancer* 53, 538-549.
- Schacht, D.V., Yamaguchi, K., Lai, J., Kulkarni, K., Sennett, C.A., and Abe, H. (2014). Importance of a personal history of breast cancer as a risk factor for the development of subsequent breast cancer: results from screening breast MRI. *AJR American journal of roentgenology* 202, 289-292.
- Semaka, A., Creighton, S., Warby, S., and Hayden, M.R. (2006). Predictive testing for Huntington disease: interpretation and significance of intermediate alleles. *Clinical genetics* 70, 283-294.
- Semaka, A., and Hayden, M. (2013). Evidence-Based Genetic Counselling Implications for Huntington Disease Intermediate Allele Predictive Test Results. *Clin Genet.*
- Semaka, A., and Hayden, M.R. (2014). Evidence-based genetic counselling implications for Huntington disease intermediate allele predictive test results. *Clinical genetics* 85, 303-311.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84-88.
- Shaw, K.R., Wrobel, C.N., and Brugge, J.S. (2004). Use of three-dimensional basement membrane cultures to model oncogene-induced changes in mammary epithelial morphogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 9, 297-310.

- Shehata, M., Teschendorff, A., Sharp, G., Novcic, N., Russell, A., Avril, S., Prater, M., Eirew, P., Caldas, C., Watson, C.J., *et al.* (2012). Phenotypic and functional characterization of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast cancer research : BCR* 14, R134.
- Shirasaki, D.I., Greiner, E.R., Al-Ramahi, I., Gray, M., Boontheung, P., Geschwind, D.H., Botas, J., Coppola, G., Horvath, S., Loo, J.A., *et al.* (2012). Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron* 75, 41-57.
- Siamakpour-Reihani, S., Caster, J., Bandhu Nepal, D., Courtwright, A., Hilliard, E., Usary, J., Ketelsen, D., Darr, D., Shen, X.J., Patterson, C., *et al.* (2011). The role of calcineurin/NFAT in SFRP2 induced angiogenesis--a rationale for breast cancer treatment with the calcineurin inhibitor tacrolimus. *PloS one* 6, e20412.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., *et al.* (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine* 344, 783-792.
- Sleeman, K.E., Kendrick, H., Ashworth, A., Isacke, C.M., and Smalley, M.J. (2006). CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast cancer research : BCR* 8, R7.
- Sleeman, K.E., Kendrick, H., Robertson, D., Isacke, C.M., Ashworth, A., and Smalley, M.J. (2007). Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *The Journal of cell biology* 176, 19-26.
- Smith-Warner, S.A., Spiegelman, D., Yaun, S.S., van den Brandt, P.A., Folsom, A.R., Goldbohm, R.A., Graham, S., Holmberg, L., Howe, G.R., Marshall, J.R., *et al.* (1998). Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 279, 535-540.
- Smith, G.H. (1996). Experimental mammary epithelial morphogenesis in an in vivo model: evidence for distinct cellular progenitors of the ductal and lobular phenotype. *Breast cancer research and treatment* 39, 21-31.
- Snell, R.G., MacMillan, J.C., Cheadle, J.P., Fenton, I., Lazarou, L.P., Davies, P., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Harper, P.S., and Shaw, D.J. (1993). Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* 4, 393-397.
- Song, Y.N., Geng, J.S., Liu, T., Zhong, Z.B., Liu, Y., Xia, B.S., Ji, H.F., Li, X.M., Zhang, G.Q., Ren, Y.L., *et al.* (2012). Long CAG repeat sequence and protein expression of androgen receptor considered as prognostic indicators in male breast carcinoma. *PloS one* 7, e52271.
- Sopel, M. (2010). The myoepithelial cell: its role in normal mammary glands and breast cancer. *Folia morphologica* 69, 1-14.
- Sorensen, S.A., and Fenger, K. (1992). Causes of death in patients with Huntington's disease and in unaffected first degree relatives. *Journal of medical genetics* 29, 911-914.
- Sorensen, S.A., Fenger, K., and Olsen, J.H. (1999). Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: An apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? *Cancer* 86, 1342-1346.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor

subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10869-10874.

Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., *et al.* (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8418-8423.

Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **51**, 1409-1416.

Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., and Mak, T.W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**, 29-39.

Steffan, J.S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L.C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y.Z., Cattaneo, E., *et al.* (2004). SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* **304**, 100-104.

Steffan, J.S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y.Z., Gohler, H., Wanker, E.E., Bates, G.P., Housman, D.E., and Thompson, L.M. (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6763-6768.

Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., and Eaves, C.J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* **439**, 993-997.

Streuli, C.H., and Bissell, M.J. (1990). Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. *The Journal of cell biology* **110**, 1405-1415.

Strong, T.V., Tagle, D.A., Valdes, J.M., Elmer, L.W., Boehm, K., Swaroop, M., Kaatz, K.W., Collins, F.S., and Albin, R.L. (1993). Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nature genetics* **5**, 259-265.

Swami, M., Hendricks, A.E., Gillis, T., Massood, T., Mysore, J., Myers, R.H., and Wheeler, V.C. (2009). Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset. *Human molecular genetics* **18**, 3039-3047.

Takano, H., and Gusella, J.F. (2002). The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF-kB/Rel/dorsal family transcription factor. *BMC neuroscience* **3**, 15.

Talhok, R.S., Bissell, M.J., and Werb, Z. (1992). Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *The Journal of cell biology* **118**, 1271-1282.

Tamimi, R.M., Byrne, C., Colditz, G.A., and Hankinson, S.E. (2007). Endogenous hormone levels, mammographic density, and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute* **99**, 1178-1187.

Tang, J., Ahmad, A., and Sarkar, F.H. (2012). The Role of MicroRNAs in Breast Cancer Migration, Invasion and Metastasis. *International journal of molecular sciences* **13**, 13414-13437.

Tao, K., Fang, M., Alroy, J., and Sahagian, G.G. (2008). Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC cancer* **8**, 228.

- Tassicker, R.J., Teltscher, B., Trembath, M.K., Collins, V., Sheffield, L.J., Chiu, E., Gurrin, L., and Delatycki, M.B. (2009). Problems assessing uptake of Huntington disease predictive testing and a proposed solution. *European journal of human genetics : EJHG* 17, 66-70.
- Telenius, H., Kremer, B., Goldberg, Y.P., Theilmann, J., Andrew, S.E., Zeisler, J., Adam, S., Greenberg, C., Ives, E.J., Clarke, L.A., *et al.* (1994). Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. *Nature genetics* 6, 409-414.
- Teschendorff, A.E., Journee, M., Absil, P.A., Sepulchre, R., and Caldas, C. (2007). Elucidating the altered transcriptional programs in breast cancer using independent component analysis. *PLoS computational biology* 3, e161.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 131-142.
- Tokes, A.M., Szasz, A.M., Juhasz, E., Schaff, Z., Harsanyi, L., Molnar, I.A., Baranyai, Z., Besznyak, I., Jr., Zarand, A., Salamon, F., *et al.* (2012). Expression of tight junction molecules in breast carcinomas analysed by array PCR and immunohistochemistry. *Pathology oncology research : POR* 18, 593-606.
- Tokunaga, M., Land, C.E., Yamamoto, T., Asano, M., Tokuoka, S., Ezaki, H., and Nishimori, I. (1987). Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1980. *Radiation research* 112, 243-272.
- Toullec, A., Gerald, D., Despouy, G., Bourachot, B., Cardon, M., Lefort, S., Richardson, M., Rigai, G., Parrini, M.C., Lucchesi, C., *et al.* (2010). Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO molecular medicine* 2, 211-230.
- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E.C., and Mandel, J.L. (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nature genetics* 10, 104-110.
- van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., *et al.* (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.
- van de Vijver, M.J., He, Y.D., van't Veer, L.J., Dai, H., Hart, A.A., Voskuil, D.W., Schreiber, G.J., Peterse, J.L., Roberts, C., Marton, M.J., *et al.* (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *The New England journal of medicine* 347, 1999-2009.
- van der Burg, J.M., Bjorkqvist, M., and Brundin, P. (2009). Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet neurology* 8, 765-774.
- Vargo-Gogola, T., and Rosen, J.M. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature reviews Cancer* 7, 659-672.
- Villadsen, R., Fridriksdottir, A.J., Ronnov-Jessen, L., Gudjonsson, T., Rank, F., LaBarge, M.A., Bissell, M.J., and Petersen, O.W. (2007). Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *The Journal of cell biology* 177, 87-101.
- Vincent-Salomon, A., Lucchesi, C., Gruel, N., Raynal, V., Pierron, G., Goudefroye, R., Rey, F., Radvanyi, F., Salmon, R., Thiery, J.P., *et al.* (2008). Integrated genomic and transcriptomic analysis of

ductal carcinoma in situ of the breast. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 1956-1965.

Vincent-Salomon, A., Macgrogan, G., Charaffe-Jauffret, E., Jacquemier, J., and Arnould, L. (2010). [Identification of basal-like carcinomas in clinical practice: "triple zero/BRCA1-like" carcinomas]. *Bulletin du cancer* 97, 357-363.

Visvader, J.E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & development* 23, 2563-2577.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2011). The unmasking of novel unipotent stem cells in the mammary gland. *The EMBO journal* 30, 4858-4859.

Volinia, S., Galasso, M., Sana, M.E., Wise, T.F., Palatini, J., Huebner, K., and Croce, C.M. (2012). Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 3024-3029.

Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., and Richardson, E.P., Jr. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 44, 559-577.

Waelter, S., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Nordhoff, E., Lurz, R., Goehler, H., Gauss, C., Sathasivam, K., Bates, G.P., Lehrach, H., *et al.* (2001). The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis. *Human molecular genetics* 10, 1807-1817.

Wagner, K.U., Wall, R.J., St-Onge, L., Gruss, P., Wynshaw-Boris, A., Garrett, L., Li, M., Furth, P.A., and Hennighausen, L. (1997). Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic acids research* 25, 4323-4330.

Walker, F.O. (2007). Huntington's disease. *Lancet* 369, 218-228.

Wang, C.E., Tydlacka, S., Orr, A.L., Yang, S.H., Graham, R.K., Hayden, M.R., Li, S., Chan, A.W., and Li, X.J. (2008). Accumulation of N-terminal mutant huntingtin in mouse and monkey models implicated as a pathogenic mechanism in Huntington's disease. *Human molecular genetics* 17, 2738-2751.

Wang, Q., Zhang, H., Kajino, K., and Greene, M.I. (1998). BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. *Oncogene* 17, 1939-1948.

Wang, Y., and Zhou, B.P. (2011). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chinese journal of cancer* 30, 603-611.

Wanker, E.E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J., and Lehrach, H. (1997). HIP-1: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Human molecular genetics* 6, 487-495.

Warby, S.C., Chan, E.Y., Metzler, M., Gan, L., Singaraja, R.R., Crocker, S.F., Robertson, H.A., and Hayden, M.R. (2005). Huntingtin phosphorylation on serine 421 is significantly reduced in the striatum and by polyglutamine expansion in vivo. *Human molecular genetics* 14, 1569-1577.

Warby, S.C., Doty, C.N., Graham, R.K., Shively, J., Singaraja, R.R., and Hayden, M.R. (2009). Phosphorylation of huntingtin reduces the accumulation of its nuclear fragments. *Molecular and cellular neurosciences* 40, 121-127.

- Watson, C.J. (2006). Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast cancer research : BCR* 8, 203.
- Weber, M., Davies, J.J., Wittig, D., Oakeley, E.J., Haase, M., Lam, W.L., and Schubeler, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature genetics* 37, 853-862.
- Weigelt, B., Geyer, F.C., Horlings, H.M., Kreike, B., Halfwerk, H., and Reis-Filho, J.S. (2009). Mucinous and neuroendocrine breast carcinomas are transcriptionally distinct from invasive ductal carcinomas of no special type. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 22, 1401-1414.
- Weigelt, B., Geyer, F.C., and Reis-Filho, J.S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they? *Molecular oncology* 4, 192-208.
- Weigelt, B., Glas, A.M., Wessels, L.F., Witteveen, A.T., Peterse, J.L., and van't Veer, L.J. (2003). Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15901-15905.
- Weigelt, B., Horlings, H.M., Kreike, B., Hayes, M.M., Hauptmann, M., Wessels, L.F., de Jong, D., Van de Vijver, M.J., Van't Veer, L.J., and Peterse, J.L. (2008). Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *The Journal of pathology* 216, 141-150.
- Weigelt, B., Hu, Z., He, X., Livasy, C., Carey, L.A., Ewend, M.G., Glas, A.M., Perou, C.M., and Van't Veer, L.J. (2005). Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer research* 65, 9155-9158.
- Wellings, S.R., and Jensen, H.M. (1973). On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *Journal of the National Cancer Institute* 50, 1111-1118.
- Wellings, S.R., Jensen, H.M., and Marcum, R.G. (1975). An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *Journal of the National Cancer Institute* 55, 231-273.
- Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Gutekunst, C.A., Rogers, D., Warby, S., Graham, R.K., Loubser, O., van Raamsdonk, J., Singaraja, R., Yang, Y.Z., *et al.* (2002). Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 7862-7872.
- Wellington, C.L., Singaraja, R., Ellerby, L., Savill, J., Roy, S., Leavitt, B., Cattaneo, E., Hackam, A., Sharp, A., Thornberry, N., *et al.* (2000). Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 19831-19838.
- Wen, J., Kawamata, Y., Tojo, H., Tanaka, S., and Tachi, C. (1995). Expression of whey acidic protein (WAP) genes in tissues other than the mammary gland in normal and transgenic mice expressing mWAP/hGH fusion gene. *Molecular reproduction and development* 41, 399-406.
- Willipinski-Stapelfeldt, B., Riethdorf, S., Assmann, V., Woelfle, U., Rau, T., Sauter, G., Heukeshoven, J., and Pantel, K. (2005). Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 8006-8014.
- Willott, E., Balda, M.S., Fanning, A.S., Jameson, B., Van Itallie, C., and Anderson, J.M. (1993). The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of

septate junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7834-7838.

Wolff, A.C., Hammond, M.E., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., *et al.* (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 118-145.

Wong, A.K., Pero, R., Ormonde, P.A., Tavtigian, S.V., and Bartel, P.L. (1997). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *The Journal of biological chemistry* 272, 31941-31944.

Wooster, R., Neuhausen, S.L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D., *et al.* (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. *Science* 265, 2088-2090.

Wu, L.C., Wang, Z.W., Tsan, J.T., Spillman, M.A., Phung, A., Xu, X.L., Yang, M.C., Hwang, L.Y., Bowcock, A.M., and Baer, R. (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the *BRCA1* gene product. *Nature genetics* 14, 430-440.

Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J.F., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W., and Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer research* 67, 2649-2656.

Xia, J., Lee, D.H., Taylor, J., Vandelft, M., and Truant, R. (2003). Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Human molecular genetics* 12, 1393-1403.

Yanai, A., Huang, K., Kang, R., Singaraja, R.R., Arstikaitis, P., Gan, L., Orban, P.C., Mullard, A., Cowan, C.M., Raymond, L.A., *et al.* (2006). Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function. *Nature neuroscience* 9, 824-831.

Yang, H., Jeffrey, P.D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N.H., Zheng, N., Chen, P.L., Lee, W.H., and Pavletich, N.P. (2002). *BRCA2* function in DNA binding and recombination from a *BRCA2*-DSS1-ssDNA structure. *Science* 297, 1837-1848.

Yao, J., Weremowicz, S., Feng, B., Gentleman, R.C., Marks, J.R., Gelman, R., Brennan, C., and Polyak, K. (2006). Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. *Cancer research* 66, 4065-4078.

Yeo, B., Turner, N.C., and Jones, A. (2014). An update on the medical management of breast cancer. *Bmj* 348, g3608.

Yerushalmi, R., Hayes, M.M., and Gelmon, K.A. (2009). Breast carcinoma--rare types: review of the literature. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 20, 1763-1770.

Yoeli-Lerner, M., Yiu, G.K., Rabinovitz, I., Erhardt, P., Jauliac, S., and Toker, A. (2005). Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Molecular cell* 20, 539-550.

Young, L.J., Medina, D., DeOme, K.B., and Daniel, C.W. (1971). The influence of host and tissue age on life span and growth rate of serially transplanted mouse mammary gland. *Experimental gerontology* 6, 49-56.

- Zala, D., Hinckelmann, M.V., Yu, H., Lyra da Cunha, M.M., Liot, G., Cordelieres, F.P., Marco, S., and Saudou, F. (2013). Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell* 152, 479-491.
- Zeitlin, S., Liu, J.P., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., and Efstratiadis, A. (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nature genetics* 11, 155-163.
- Zhang, H., Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Zhang, H., Bi, D., Weber, B.L., and El-Deiry, W.S. (1998). BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* 16, 1713-1721.
- Zhang, Y., Leavitt, B.R., van Raamsdonk, J.M., Dragatsis, I., Goldowitz, D., MacDonald, M.E., Hayden, M.R., and Friedlander, R.M. (2006). Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *The EMBO journal* 25, 5896-5906.
- Zheng, L., Annab, L.A., Afshari, C.A., Lee, W.H., and Boyer, T.G. (2001). BRCA1 mediates ligand-independent transcriptional repression of the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9587-9592.
- Zheng, Z., and Diamond, M.I. (2012). Huntington disease and the huntingtin protein. *Progress in molecular biology and translational science* 107, 189-214.
- Zheng, Z., Zhu, H., Wan, Q., Liu, J., Xiao, Z., Siderovski, D.P., and Du, Q. (2010). LGN regulates mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis. *The Journal of cell biology* 189, 275-288.
- Zhu, L., Song, X., Tang, J., Wu, J., Ma, R., Cao, H., Ji, M., Jing, C., and Wang, Z. (2013). Huntingtin-associated protein 1: a potential biomarker of breast cancer. *Oncology reports* 29, 1881-1887.
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Timmusk, T., *et al.* (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature genetics* 35, 76-83.

RÉSUMÉ

La huntingtine (HTT) est une protéine d'échafaudage participant à des fonctions indispensables au bon fonctionnement cellulaire. Elle est codée par le gène *HTT* qui présente une répétition polymorphique de triplet CAG. Une répétition excédant 35 CAG dans la *HTT* est à l'origine de la maladie de Huntington, une maladie neurodégénérative héréditaire sévère. Ainsi, bien que d'expression ubiquitaire, la HTT est principalement étudiée dans le système nerveux. Par exemple, ses implications dans le tissu mammaire, en condition normale et pathologique, sont inconnues. Nous avons observé que la forme mutante de la HTT accélère le développement de cancer du sein et en accentue la sévérité et que la forme sauvage est impliquée dans le développement normal de la glande mammaire. Mon projet principal de thèse était de caractériser le rôle de la HTT, de sa phosphorylation à la sérine 421 (S421-P-HTT) ainsi que du polymorphisme des répétitions CAG dans les cancers du sein.

En utilisant des modèles cellulaires et murins et par des études d'expression chez des patientes atteintes d'un cancer du sein, j'ai observé que l'expression de la HTT et de la S421-P-HTT corrèlent avec le stade de différenciation tumorale. Au niveau moléculaire, la HTT régule, par sa phosphorylation à la S421, l'expression et la localisation d'une des protéines des jonctions serrées, ZO1 et module ainsi l'adhésion intercellulaire. ZO1 colocalise avec la S421-P-HTT aux jonctions intercellulaires et forme un complexe avec la HTT. La perte d'expression de HTT est pro-métastatique chez la souris et est moindre dans les cancers du sein métastatiques. De plus, les niveaux d'expression de HTT et de ZO1 sont diminués en parallèle dans les carcinomes humains de bas grades.

J'ai également montré que le polymorphisme CAG présent dans la *HTT* sauvage joue un « double emploi » : tandis que de longues répétitions protègent de l'apparition de cancers, elles accentuent sa sévérité lorsque la maladie se développe. Dans le sous-type HER2 spécifiquement, la longueur de la répétition CAG est un facteur pronostic indépendant du développement de métastases.

Ainsi, ces travaux ont permis de mettre en évidence un rôle clé pour la HTT au cours de la progression tumorale mammaire, et devraient conduire à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de métastases dans le cancer du sein.

Mots clés : cancer du sein, HTT, polyglutamine, différenciation, adhésion, métastase, polymorphisme CAG

TITLE : Beyond the brain: a major involvement of huntingtin and its phosphorylation at serine 421 in breast cancer

ABSTRACT

Huntingtin (HTT) is a scaffold protein involved in numerous cellular mechanisms essentials for appropriate physiological functions. HTT is encoded by *HTT* gene which carries a polymorphic repetition of CAG triplet. When the CAG repetition exceeds 35, it leads to Huntington's disease, a hereditary severe neurodegenerative disorder. While HTT expression is ubiquitous, it is mainly studied in nervous system. For example, HTT roles in breast physiology and cancer are unknown. We demonstrated that mutant HTT accelerates breast tumor and metastasis development and that wild-type HTT is involved in normal mammary gland development. My main project was to characterize the roles of HTT and of its phosphorylation at S421 (S421-P-HTT) and that of the polymorphic CAG length in mammary carcinomas.

First, leaning on cellular and murine models as well as on expression studies in breast cancer patients, I observed that HTT and S421-P-HTT expression correlates with tumoral differentiation stage. At the molecular level, HTT regulates through its phosphorylation at S421, the expression and localization of ZO1, a marker of intercellular junction and therefore modulates intercellular adhesion. ZO1 colocalizes with S421-P-HTT specifically at tight junctions and forms a complex with HTT. Loss of HTT is itself pro-metastatic in mice and is decreased in metastatic human breast cancer. Moreover, HTT and ZO1 are concomitantly downregulated in low-grade human carcinomas.

On the other hand, the polymorphism of CAG repetitions in *HTT* has a dual-purpose: while long repetitions protect against cancer development, it increases its severity once cancer is developed. In HER2 subtype specifically, HTT appears as an independent prognostic factor of metastasis development.

Thus, these studies point out a key function of HTT outside the brain during mammary carcinoma progression and should lead to a better understanding of molecular mechanisms involved in metastasis development.

Keywords: breast cancer, huntingtin, polyglutamine, differentiation, adhesion, metastasis, CAG polymorphism

LABORATOIRE D'ACCUEIL

Institut Curie - Inserm U1005 - UMR3306 CNRS - Equipe « *Huntingtine, Neurogenèse et Cancer* »
Bâtiment 110 Centre Universitaire - Orsay